

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Mécanismes contributifs au développement de la stéatose hépatique non  
alcoolique (SHNA): effets de l'entraînement**

par  
Natalie A. Chapados

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en sciences de l'activité physique

Février, 2009

© Natalie A. Chapados, 2009.



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Mécanismes contributifs au développement de la stéatose hépatique non  
alcoolique (SHNA): effets de l'entraînement**

présentée par:

Natalie A. Chapados

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Suzanne Laberge,	président-rapporteur
Jean-Marc Lavoie,	directeur de recherche
François Péronnet,	membre du jury
Yves Deshaies,	examineur externe
Louise Béliveau,	représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le: .....

## RÉSUMÉ

Le développement de la stéatose hépatique non alcoolique (SHNA) résulte principalement d'une augmentation du taux d'importation des acides gras non estérifiés (AGNE) issus de l'alimentation et/ou de la lipolyse adipocytaire et d'une altération de la sécrétion hépatique des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) [159]. Par ailleurs, des évidences récentes suggèrent la présence d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) hépatique associée à l'induction d'une SHNA chez l'animal [278]. En contre-partie, l'entraînement en endurance semble efficace pour prévenir et traiter le développement de la SHNA et de certaines conséquences qui lui sont reliées, i.e. résistance à l'insuline. Cependant, la confirmation de l'efficacité de l'entraînement s'effectue généralement par le suivi des paramètres associées à la SHNA, i.e. triacylglycérols (TAG) hépatiques, adiposité, plutôt que par l'étude des mécanismes contributifs au développement de la SHNA et des altérations cellulaires reliées à la SHNA. Le rétablissement de facteurs responsables de l'équilibre entre les voies d'importation et les voies de sécrétion des lipides hépatiques de même que l'atténuation ou l'inhibition de l'apparition du stress du RE pourraient être des mécanismes par lesquels l'entraînement en endurance exerce ses effets bénéfiques sur la SHNA.

La première étude de cette thèse visait à déterminer si l'entraînement en endurance diminue le taux de la lipolyse adipocytaire chez des rats soumis à une diète riche en lipides, et si cette diminution peut être liée à l'augmentation de l'expression adipocytaire de la périlipine (PLIN), une protéine de séquestration des lipides. Nos résultats ont montré que le taux de la lipolyse adipocytaire *in vitro* du tissu adipeux mésentérique est atténué de ~57% suite à un entraînement en endurance en concomitance avec une diète riche en lipides, et ce indépendamment du contenu protéique de la PLIN. L'objectif de la seconde étude était d'étudier les effets de l'entraînement physique sur la capacité du foie à éliminer les lipides par la production de VLDL-triacylglycérols (TAG) hépatique, ainsi que l'expression de la protéine-clé de cette synthèse, la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). Les résultats de cette étude ont montré que la production *in vivo* de VLDL-TAG hépatique de même que le contenu protéique de la MTP hépatique

étaient diminuée de 28% et de 23% respectivement, chez les animaux entraînés soumis à une diète riche en lipides. Finalement, l'objectif de la dernière étude était d'investiguer les effets de l'entraînement en endurance sur le stress du RE hépatique induit par l'inhibition de l'activité de la MTP. Chez des rats soumis à une diète riche en lipides, l'effet de l'administration d'un inhibiteur (MTPX) a entraîné une accumulation sévère de TAG hépatiques (~9-fois plus élevée en comparaison au groupe de rats injectés avec un placebo). L'entraînement en endurance a augmenté l'expression génique de la protéine chaperon Bip/GRP78 de 28% et 30% dans les groupes placebo et MTPX, chez les rats soumis à une diète riche en lipides en comparaison à des rats sédentaires soumis à la même diète. Dans l'ensemble, les résultats des études conduites dans le cadre de cette thèse indiquent que la lipolyse adipocytaire et la production de VLDL sont des mécanismes impliqués dans l'effet bénéfique de l'exercice physique sur la SHNA. De plus, l'exercice physique régulier s'avère également un outil pour réduire l'effet de la SHNA sur le stress du RE.

**Mots clés:** Foie, obésité, stéatose hépatique, entraînement, métabolisme des lipides, lipolyse, lipoprotéine à très basse densité, réticulum endoplasmique, périlipine, *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) .

## ABSTRACT

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) primarily results from an increased non esterified fatty acid (NEFA) uptake derived from nutrition and/or adipose tissue lipolysis, and an alteration in very-low density lipoprotein (VLDL) hepatic secretion [159]. Furthermore, recent studies suggest the presence of hepatic endoplasmic reticulum (ER) stress in dietary induced NAFLD models in animal models [278]. On the other hand, endurance training has been shown to be efficient in prevention and treatment of NAFLD, as well as in the improvement of metabolic complications such as insulin resistance, which is associated with NAFLD. However, the beneficial effects of endurance training have only been reported by observations of parameters related to NAFLD, which include hepatic triacylglycerols (TAG) and adiposity, instead of the study of contributing mechanisms leading to the development of NAFLD. Reestablishing the responsible factors contributing to the equilibrium between hepatic lipid accumulation and degradation pathways, as well as attenuation or complete suppression of ER stress are possible mechanisms by which endurance training could have beneficial effects.

The purpose of the first study was to determine the effects of an exercise-training program in high-fat (HF) fed rats on *in vitro* adipocyte lipolysis, and its relationship to perilipin content (PLIN). Training decreased by ~57% *in vitro* adipocyte lipolysis in the mesenteric tissue, compared to sedentary rats, independently from PLIN content. The purpose of the second study was to investigate the effects of an exercise-training program on hepatic *in vivo* VLDL-TAG production and its relation to hepatic content of microsomal triglyceride transfer protein (MTP). Our results showed that training reduced hepatic *in vivo* VLDL-TAG production and liver MTP protein content by 28% and 23% respectively, in high-fat fed rats. Finally, the purpose of the third study was to examine the effects of endurance training on hepatic ER stress induced by MTP activity inhibition. In HF fed rats, MTP inhibition resulted in a significant hepatic TAG accumulation (~9-fold compared to rats injected a placebo). Training increased Bip/GRP78 mRNA levels in placebo (28%) and MTPX (30%) injected rats, in high-fat fed rats compared to sedentary groups. Taken together, these results indicate that adipocyte lipolysis and

VLDL production are mechanisms implicated in the beneficial effects of exercise training on NAFLD development. Moreover, regular exercise training could be an efficient therapeutic approach in reducing the effects of NAFLD on ER stress development.

**Keywords:** Liver, obesity, hepatic steatosis, exercise training, lipid metabolism, lipolysis, very-low density protein (VLDL), reticulum endoplasmic, perilipin, microsomal triglyceride transfer protein (MTP).

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ . . . . .	iii
ABSTRACT . . . . .	v
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	vii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	ix
LISTE DES FIGURES . . . . .	x
LISTE DES SIGLES . . . . .	xii
DÉDICACE . . . . .	xiv
REMERCIEMENTS . . . . .	xv
AVANT-PROPOS . . . . .	xvi

## CHAPITRE 1 : MÉCANISMES CONTRIBUTIFS AU DÉVELOPPEMENT DE LA SHNA

1.1 Voies d'accumulation des lipides au foie . . . . .	1
1.1.1 Les acides gras non estérifiés . . . . .	1
1.1.2 Entraînement physique et lipolyse adipocytaire . . . . .	21
1.1.3 La lipogenèse <i>de novo</i> hépatique . . . . .	33
1.2 Voie d'élimination des lipides hépatiques . . . . .	38
1.2.1 L'oxydation des lipides hépatiques . . . . .	38
1.2.2 La production des VLDL hépatiques . . . . .	44
1.2.3 Entraînement et production de VLDL-TAG hépatiques . . . . .	54
1.3 Conséquences associées à la SHNA : le stress du RE hépatique . . . . .	55
1.3.1 Généralités sur le métabolisme du RE . . . . .	55
1.3.2 La <i>unfolded protein response</i> (UPR) . . . . .	56
1.3.3 L'entraînement et le stress du RE . . . . .	66



<b>CHAPITRE 2 : ARTICLES</b>	<b>68</b>
2.1 Objectifs généraux et spécifiques	68
2.2 Article 1	70
2.3 Article 2	95
2.4 Article 3	120
<b>CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>158</b>

## LISTE DES TABLEAUX

1.I	La régulation lipolytique <i>in vitro</i> par la régionalisation. . . . .	20
1.II	Tableau synthèse. . . . .	23
2.I	Body composition and metabolic characteristics . . . . .	86
2.II	Body composition and metabolic characteristics . . . . .	110
2.III	Oligonucleotide primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction. 137	
2.IV	Body composition and metabolic characteristics - SD diet . . . . .	137
2.V	Body composition and metabolic characteristics - HF diet . . . . .	138

## LISTE DES FIGURES

1.1	Voies d'accumulation et d'élimination des lipides hépatiques. . . . .	2
1.2	Mécanisme de la lipolyse adipocytaire. . . . .	6
1.3	Remodelage de la gouttelette lipidique. . . . .	6
1.4	Substances stimulatrices et inhibitrices de la lipolyse . . . . .	10
1.5	L'IMC et la lipolyse basale adipocytaire. . . . .	12
1.6	Corrélation entre la lipolyse basale et l'IMC. . . . .	12
1.7	Lipolyse adipocytaire stimulée et obésité . . . . .	15
1.8	Lipolyse adipocytaire stimulée, obésité et effort aigu . . . . .	15
1.9	Métabolisme des lipides dans un contexte de SHNA . . . . .	17
1.10	Lipolyse basale et lors d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique . . . . .	18
1.11	Voie de la lipogenèse <i>de novo</i> . . . . .	34
1.12	Activité synergique des facteurs de transcription SREBP1-c et de ChREBP. . . . .	37
1.13	$\beta$ -oxydation mitochondriale. . . . .	39
1.14	Relation entre les voies d'oxydation lipidique au foie. . . . .	41
1.15	$\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxisomale chez des sujets SHNA. . . . .	43
1.16	Cycle futile existant au sein des hépatocytes. . . . .	46
1.17	Mécanisme et régulation de la synthèse des VLDL hépatiques. . . . .	48
1.18	Voie de la réponse UPR. . . . .	59
1.19	Stress du RE chez deux modèles d'obésité. . . . .	61
1.20	Le stress du RE hépatique et l'inhibition de la voie de l'insuline. . . . .	63
1.21	Relation hypothétique : le stress du RE hépatique, l'IR et la SHNA. . . . .	65
2.1	Lipolyse du tissu mésentérique . . . . .	88
2.2	Lipolyse du tissu rétro-péritonéal . . . . .	89
2.3	Contenu protéique de la périlipine du tissu mésentérique . . . . .	90
2.4	AGNE plasmatiques et TAG hépatiques . . . . .	112
2.5	TAG plasmatiques . . . . .	113
2.6	Contenu protéique de la MTP hépatique . . . . .	114

2.7	Concentrations TAG, AST et ALT (rats SD) . . . . .	140
2.8	ARNm des marqueurs du stress du RE (rats SD) . . . . .	141
2.9	Concentrations TAG, AST et ALT (rats HF) . . . . .	142
2.10	ARNm des marqueurs du stress du RE (rats HF) . . . . .	143
3.1	Figure synthèse . . . . .	153

## LISTE DES SIGLES

AGNE	Acides gras non estérifiés
AMP	Adénosine monophosphate
apoB	Apolipoprotéine B
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
°C	Degré Celsius
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CM	Chylomicrons
CM Rem	Chylomicrons résiduels
CoA	Coenzyme A
CPT-1	Carnitine palmitoyl transférase I
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
DGAT-1	Diacylglycérol acyltransférase-1
DGAT-2	Diacylglycérol acyltransférase-2
DNL	Lipogenèse <i>de novo</i>
ER	Réticulum endoplasmique
FA	Fatty acids
FAS	Fatty acid synthase
FFA	Free fatty acids

HF	Diète riche en lipides
HSL	Hormone sensitive lipase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mM	Millimolaire ou mmol/L
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1
PLIN	Périlipine
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
SD	Standard diet
Sed	Sédentaire
sem	Semaine
SHNA	Stéatose hépatique non-alcoolique
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
TAG	Triacylglycérols
Tr	Entraînement physique
UPR	Unfolded protein response
VLDL	Very-low density lipoprotein

À la mémoire d'une femme remarquable et d'un modèle de persévérance,  
ma grand-mère Yvette.

## REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Jean-Marc Lavoie, pour l'aide et l'encouragement prodigués tout au long de ce travail de recherche. Son intérêt et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit dans la réalisation de mon doctorat.

J'aimerais aussi remercier mes "helpers", collaborateurs et collègues qui m'ont apporté une aide précieuse durant mes projets : Pascal Collin, Élise l'experte "compteuse d'adipocytes" Dufresne, Maximilian Léger et Julie Couture, mes deux "ratsitter" préférés, Marie-Claude Côté et Raphaëlle Fadous pour leur assiduité hors pair, leur dévouement, leur précieuse amitié et de nombreuses conversations qui ont su faire passer les heures du labo à une vitesse incroyable!!!! Un merci particulier à Amélie "the flavor of the week" Paquette pour son support moral et sa précieuse aide prodiguée à la réalisation de cette thèse. À Jonathan "la brute" Tremblay, pour son aide technique, ses farces et ses "high-five". Merci à Antony, Naser, Azin et Simon pour votre présence et votre écoute. Merci aux membres du personnel, Chantale, Lucille, Arielle, Micheline, pour vos sourires qui éclairaient ma journée. À Pierre Corriveau pour son aide technique dans le labo.

Le dernier et non le moindre des mercis, à ma mère Shirley, mon père Réjean, mes frères Patrick et Jason, mes belles-soeurs Geneviève et Mélissa, Nanny, Aunt Sandra, mes deux rayons de soleil et sources d'inspiration : mes neveux Jérémy et Félix "flic-flac", ma future nièce, ma famille et mes amis pour vos conseils, vos encouragements, votre GRANDE écoute, votre support INCROYABLE et surtout votre patience d'ange qui ont su me motiver tout au long de ce travail de recherche.



## AVANT-PROPOS

La stéatose hépatique non alcoolique (SHNA) est une manifestation hépatique caractérisée par une accumulation chronique et anormalement élevée de lipides au sein des hépatocytes en l'absence d'une consommation excessive d'alcool [70]. Le terme SHNA regroupe un spectre de lésions hépatiques allant de la simple stéatose à la stéatohépatite, la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome, déterminées par la sévérité de l'atteinte hépatique [204]. La SHNA représente la plus commune des pathologies hépatiques des sociétés industrialisées [6] et affecte plus du tiers des individus [7, 193]. La SHNA primaire s'inscrit dans le contexte de l'obésité [70], de l'insulino-résistance [106] et du diabète de type 2 [44, 193], alors que la SHNA secondaire peut résulter de causes nutritionnelles, métaboliques, génétiques et pharmacologiques [7]. Bien que la SHNA soit principalement associée à l'obésité et au diabète de type 2, elle est également liée à des perturbations cellulaires comme le stress du réticulum endoplasmique (RE).

Différentes interventions sont utilisées pour traiter ou prévenir le développement de la SHNA, dont l'entraînement physique. À cet égard, les études conduites dans le laboratoire de Jean-Marc Lavoie portent sur l'étude des effets protecteurs de l'entraînement sur certains mécanismes impliqués dans l'accumulation hépatique de lipides, de même que sur des déséquilibres métaboliques associés à la SHNA, telle l'obésité. Notamment, Gauthier et al. [90] ont rapporté qu'un entraînement en endurance imposé à des rats en concomitance à une diète riche en lipides atténuait l'infiltration des triacylglycérols (TAG) au foie et diminuait la masse du tissu adipeux par rapport à des animaux sédentaires soumis à la même diète. Cependant, aucune étude dans notre laboratoire n'a porté sur les effets d'un entraînement en endurance sur les paramètres contributifs au développement de la SHNA, de même que sur les altérations cellulaires que peut engendrer la SHNA.

L'objectif des études qui composent la présente thèse était donc d'évaluer les effets de l'entraînement en endurance sur une voie d'accumulation et une voie d'élimination de lipides au foie, ainsi que sur le stress du RE hépatique. Puisqu'il est bien documenté qu'une diète riche en lipides stimule l'accumulation de lipides au niveau du foie et repré-

sente un modèle d'induction de l'obésité [92, 149], une partie des études expérimentales a été conduite chez des rats soumis à une diète riche en lipides.

Chez l'humain et l'animal, il a été suggéré qu'une augmentation de lipides au sein de l'adipocyte résulte en l'augmentation du taux de la lipolyse adipocytaire et une augmentation de la libération d'AGNE [228, 253]. De plus, une alimentation riche en lipides semble stimuler la lipolyse adipocytaire basale et stimulée, et de ce fait peut contribuer à l'augmentation des taux plasmatiques d'AGNE [24]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'entraînement diminue significativement l'accumulation de lipides au sein de l'adipocyte ainsi que les taux d'AGNE plasmatiques chez des rats soumis à un régime riche en lipides [90]. Les résultats de ces études nous ont mené à l'élaboration de l'hypothèse que la diminution des AGNE plasmatiques notée chez les animaux entraînés serait possiblement due à la diminution des taux lipolytiques des adipocytes. L'objectif de la première étude donc était d'évaluer si l'entraînement en endurance diminue le taux de la lipolyse adipocytaire *in vitro* chez des rats soumis à une diète riche en lipides, et si cette diminution pouvait être reliée à l'augmentation de l'expression d'une protéine impliquée dans la séquestration des lipides : la périlipine (PLIN).

Dans la continuité de ce premier projet, nous avons ciblé l'étude d'un mécanisme d'élimination des lipides hépatiques pouvant contribuer au développement de la SHNA. La production de VLDL hépatiques est un processus complexe impliquant diverses molécules de régulation telles les diacylglycérols acyltransférases -1 et -2, l'*ADP-ribosylation factor-1* (ARF-1) et la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). De celles-ci, la MTP tient un rôle central dans la synthèse et la sécrétion de VLDL hépatiques [95]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'entraînement diminue les taux de sécrétion de VLDL hépatiques chez l'humain mesurée par la concentration des TAG plasmatiques [272]. Cependant, les effets de l'entraînement en endurance sur les molécules qui régulent la production de VLDL sont peu définies. Ce deuxième projet avait pour but d'étudier les effets de l'entraînement en endurance sur la production hépatique de VLDL ainsi que sur l'expression protéique de la MTP au foie.

Le réticulum endoplasmique (RE) tient un rôle important dans le processus de repliement des protéines nouvellement synthétisées dans l'organisme. Toute altération de l'ho-

méostasie du RE est associée à l'apparition d'un stress du RE et déclenche une voie nommée *unfolded protein reponse* (UPR). Récemment, l'accumulation de lipides au foie a été associée à un stress du réticulum endoplasmique chez des animaux modèles de SHNA [278]. Il a aussi été rapporté que la voie UPR était activée dans le foie d'animaux obèses et insulino-résistants [197]. D'autre part, l'entraînement semble atténuer [212], inverser [89] ou supprimer [90] l'accumulation de lipides hépatiques chez le Rat. La troisième étude de cette thèse avait pour but d'investiguer l'effet de l'entraînement sur le stress du RE hépatique relié à l'accumulation lipidique au foie induite pharmacologiquement chez des rats soumis à une diète standard ou riche en lipides.

Cette thèse se compose de trois chapitres. Le premier chapitre sera consacré à la revue de littérature, divisée en trois sections, soient : 1) les mécanismes d'accumulation des lipides au foie, particulièrement la lipolyse adipocytaire, 2) les mécanismes d'élimination des lipides hépatiques, principalement la production des VLDL hépatiques, et 3) les conséquences reliées à la SHNA, spécialement le stress du RE. Le deuxième chapitre de la thèse présente les trois études expérimentales qui la composent, alors que le dernier chapitre constitue la discussion générale des études de la thèse et la conclusion.

## CHAPITRE 1

### MÉCANISMES CONTRIBUTIFS AU DÉVELOPPEMENT DE LA SHNA

À partir d'une analyse lipidomique, Puri et al. [205] ont montré dans une étude récente que l'accumulation de lipides chez des humains avec une SHNA est principalement attribuée à l'augmentation du contenu hépatique en TAG. Les résultats de cette étude révèlent une augmentation drastique (844%) de la concentration des TAG hépatiques, suivie de celles des diacylglycérols (DAG) (157%) et du cholestérol (37%), chez des sujets avec SHNA [205]. Les sources de TAG hépatiques incluent les TAG issus de la digestion et acheminés de l'intestin au foie par les chylomicrons, et les TAG directement synthétisés par le foie à partir des acides gras non estérifiés (AGNE). Les AGNE requis pour la synthèse des TAG peuvent provenir de la circulation systémique et de la lipogenèse *de novo* hépatique (DNL). Par la suite, les TAG hépatiques peuvent être emmagasinés, sécrétés par la voie des VLDL ou voués à l'oxydation [67] (Fig. 1.1). Il semble que la SHNA résulte principalement de l'augmentation des AGNE circulants et de la stimulation des processus de synthèse des TAG hépatiques, accompagnées d'une augmentation de la sécrétion hépatique des VLDL et de l'oxydation des lipides mais insuffisante pour compenser l'accumulation hépatique de lipides. Le chapitre qui suit sera consacré à la revue des principales voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des lipides au niveau du foie.

#### 1.1 Voies d'accumulation des lipides au foie

##### 1.1.1 Les acides gras non estérifiés

La prise d'AGNE par le foie se fait principalement de façon concentration-dépendante, faisant en sorte que l'élévation des concentrations d'AGNE dans le plasma contribuerait à l'augmentation du taux d'importation et de l'accumulation des lipides intrahépatiques [263]. Donnelly et al., [67] ont montré qu'approximativement 60% de la concentration des TAG retrouvés dans le foie de patients atteints de SHNA résultait de la réestérifica-

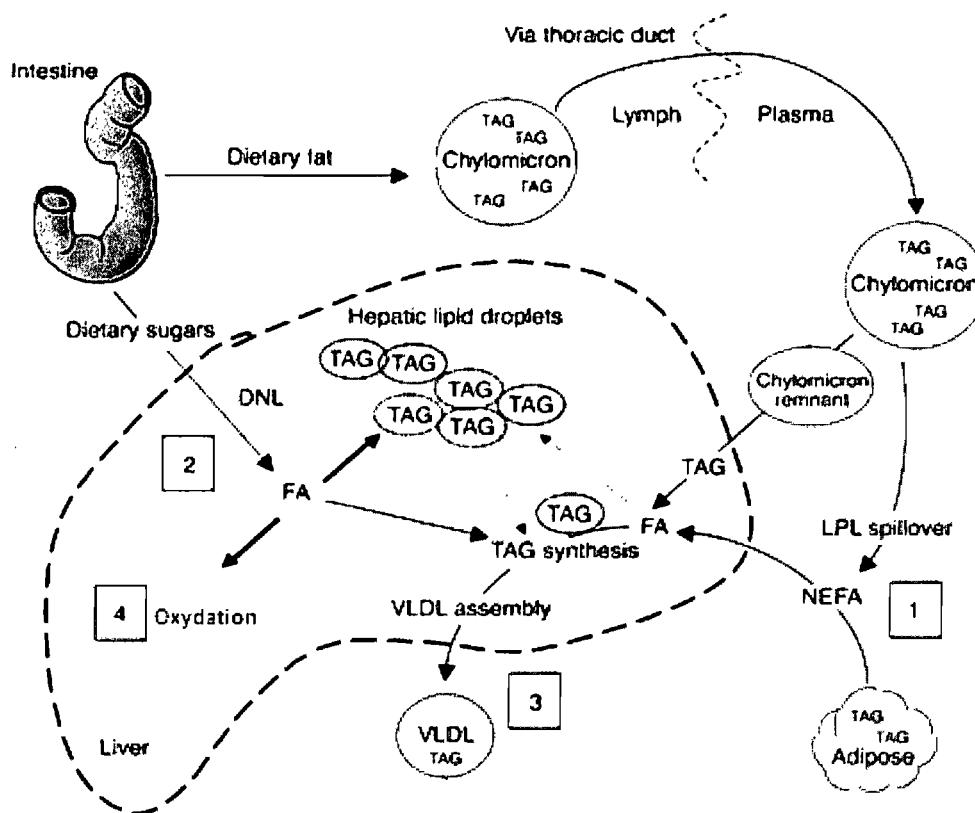


Figure 1.1 – Voies d'accumulation et d'élimination des lipides hépatiques. (1) Une augmentation des AGNE circulants issus de la lipolyse adipocytaire et du *spillover* des lipoprotéines en circulation par l'action de la LPL résulte en une augmentation de la prise d'AGNE par le foie ; (2) Une augmentation de l'activité de la lipogenèse *de novo* (DNL) augmente le contenu de lipides intrahépatiques. D'autre part, une altération dans les voies d'élimination telles (3) la production de VLDL hépatiques et (4) L'oxydation lipidique, contribue au développement de la SHNA. LPL : Lipoprotein Lipase ; NEFA : Non Esterified Fatty Acids ; FA : Fatty Acids ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein. Adapté de Donnelly et al. [67].

tion d'AGNE circulants. Bien que certaines études suggèrent une contribution non négligeable des résidus de chylomicrons (*spillover*) à l'augmentation des taux d'AGNE plasmatiques [18, 96, 118, 123], l'accroissement du taux de la lipolyse adipocytaire semble contribuer davantage à l'importation accrue d'AGNE au niveau du foie et ainsi, au développement de la SHNA [227].

### 1.1.1.1 Mécanisme de la lipolyse adipocytaire

#### *Les gouttelettes lipidiques*

L'emmagasinage des TAG se fait au sein de gouttelettes lipidiques retrouvées dans le cytosol des cellules. La formation de ces gouttelettes lipidiques se déroule dans un sous-compartiment spécialisé du réticulum endoplasmique (RE) [176] et contrairement aux adipocytes, les gouttelettes lipidiques du foie sont formées d'une simple couche de phospholipides [266]. Depuis longtemps, ces structures étaient considérées comme des réserves inertes de lipides dans le cytosol des cellules. Récemment, des résultats d'analyses protéomiques ont clairement montré que ces gouttelettes lipidiques sont des organelles dynamiques et hétérogènes composées de récepteurs membranaires, de protéines de séquestration et d'enzymes impliquées dans la synthèse, la mobilisation et la dégradation des lipides [31]. Bien que la lipolyse s'effectue dans une variété de tissus et de cellules de l'organisme, seule la lipolyse adipocytaire sera discutée dans cette thèse.

La lipolyse adipocytaire est un processus qui s'ajuste aux variations des demandes métaboliques de l'organisme. Ainsi, on retrouve une lipolyse basale et une lipolyse stimulée dans l'organisme. La lipolyse basale ou constitutive est un mécanisme continu ne requérant aucune stimulation. Lors de l'incubation de cellules d'humains sans agent de stimulation, on mesure une activité lipolytique spontanée allant de 0,3 à 1,0 mmol de glycérol/h/g tissu adipeux [9]. Le mécanisme responsable du maintien de l'activité lipolytique basale est incertain. Toutefois, il semble que la taille de l'adipocyte contribue de façon significative à l'activité lipolytique basale, puisqu'il existe une corrélation positive entre le taux de lipolyse adipocytaire et la taille de l'adipocyte [9]. À l'inverse, la lipolyse stimulée résulte de l'activation des récepteurs bêta ( $\beta$ )-adrénergiques ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ ) par différents facteurs dont les catécholamines, et se manifeste par une augmentation rapide

et drastique de la lipolyse basale [220, 265]. À la surface des adipocytes, les catécholamines (ex. : adrénaline, noradrénaline) se lient à des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés à des protéines G stimulatrices (Gs). L'activation des protéines Gs stimule celle de l'adénylate cyclase (AC), l'enzyme qui catalyse la formation d'AMP cyclique (AMPc) [69]. L'augmentation des concentrations d'AMPc dans la cellule active la protéine kinase A [20], qui catalyse la phosphorylation et l'activation subséquentes de deux molécules importantes dans la cascade lipolytique : la lipase hormono-sensible (LHS) et la périlipine (PLIN) [69, 103, 104, 124] (Fig. 1.2). La phosphorylation de la LHS permet sa translocation du cytosol vers la surface de la gouttelette lipidique et simultanément, la phosphorylation de la PLIN induit 1) une translocation de la PLIN de la surface de la gouttelette lipidique vers le cytosol ; 2) un changement de conformation de la gouttelette lipidique induit par la PLIN (Fig. 1.3) ; et 3) une stimulation de l'activité de la LHS engendrée par la PLIN à la surface de la gouttelette lipidique [124, 175, 184, 256]. Ces mécanismes de translocation et de changement de conformation de la gouttelette lipidique augmentent l'accessibilité des TAG de la gouttelette lipidique pour la LHS. Finalement, ces processus se traduisent par une augmentation de l'hydrolyse des TAG adipocytaires [69].

Récemment, une autre voie lipolytique activée par le peptide natriurétique a été découverte exclusivement chez l'humain [151]. Les peptides natriurétiques auriculaires stimulent la lipolyse différemment de la voie lipolytique stimulée par les catécholamines ; cette voie implique l'activation des récepteurs natriurétiques auriculaires de type A (NPR-A) situés à la surface des adipocytes qui stimule la guanylate cyclase et la formation subséquente de GMP cyclique. L'augmentation des concentrations cellulaires de GMPc active la protéine kinase G (PKG) et la phosphorylation subséquente de la LHS [151] (Fig. 1.2).

À l'inverse, l'activation des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques par les catécholamines inhibe la lipolyse via l'effet inhibiteur des protéines G sur l'activation de l'AC. L'insuline inhibe aussi la lipolyse - de faibles concentrations d'insuline (10 - 30  $\mu$ U/ml) sont suffisantes pour réduire de façon importante la lipolyse adipocytaire [125] - mais par un mécanisme différent. La liaison de l'insuline à son récepteur stimule la dégradation de l'AMPc via l'enzyme phosphodiesterase 3B (PDE3B), ce qui entraîne une diminution

de l'activité de la PKA et une inhibition de l'activité de la LHS [14] (Fig. 1.2).

### *Les protéines de séquestration*

La découverte des PLIN a permis de mettre en évidence le rôle crucial des protéines de séquestration adipocytaires dans le métabolisme des lipides [104]. Depuis cette découverte, quatre protéines de séquestration additionnelles ont été identifiées chez les vertébrés, donnant naissance à la famille des protéines PAT (surnommée ainsi pour péri-lipine, adipophiline et TIP47) [29]. L'OXPAT (aussi appelée *myocardial lipid droplet protein*, MLDP) est exprimée principalement dans le muscle cardiaque, les muscles squelettiques à fibres oxydatives et à un degré moindre, dans les fibres glycolytiques, les tissus adipeux blancs et bruns, et les cellules stéroïdogéniques (*i.e.* testicules et glandes surrénales) [287]. La S3-12 se retrouve surtout dans le tissu adipeux blanc et est présente à un moindre degré dans les muscles cardiaques et squelettiques [289], alors que la *tail-interacting protein 47kDa* (TIP47) est exprimée dans la majorité des cellules de l'organisme [288]. Finalement, l'*adipose differentiation related protein* (ADRP ; aussi appelée adipophiline) serait majoritairement exprimée dans la plupart des tissus non-adipeux de l'organisme [30, 288]. Au niveau du tissu adipeux, l'ADRP est exprimée principalement au début de la différenciation des adipocytes (stade pré-adipocytaire) [30] et une fois la différenciation terminée, l'expression de la PLIN devient alors prédominante [265].

Parmi les protéines de séquestration présentes chez les mammifères, la PLIN est la plus exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques [105]. Ainsi, la PLIN assure un contrôle primordial dans la mise en réserve et la mobilisation des TAG dans les adipocytes [32]. Parmi les trois isoformes de la PLIN, l'expression de l'isoforme PLIN A prédomine dans les tissus adipeux, suivie de celle de l'isoforme PLIN B, alors que l'isoforme PLIN C est principalement exprimé dans les cellules stéroïdogéniques [105, 234]. La génération de souris invalidées pour le gène PLIN (*peri*<sup>-/-</sup>) a permis de clarifier l'implication du rôle de la PLIN *in vivo*. La masse du tissu adipeux des souris *peri*<sup>-/-</sup> est inférieure de 30% à celle des souris contrôles (*peri*<sup>+/+</sup>) et de plus, les souris *peri*<sup>-/-</sup> démontrent une résistance au développement de l'obésité induite par une diète riche en lipides [264]. Similairement, l'absence de PLIN chez les souris génétiquement obèses *Lepr*<sup>db/db</sup> inverse l'obésité observée par une diminution de 37 à 74% de la masse de dif-



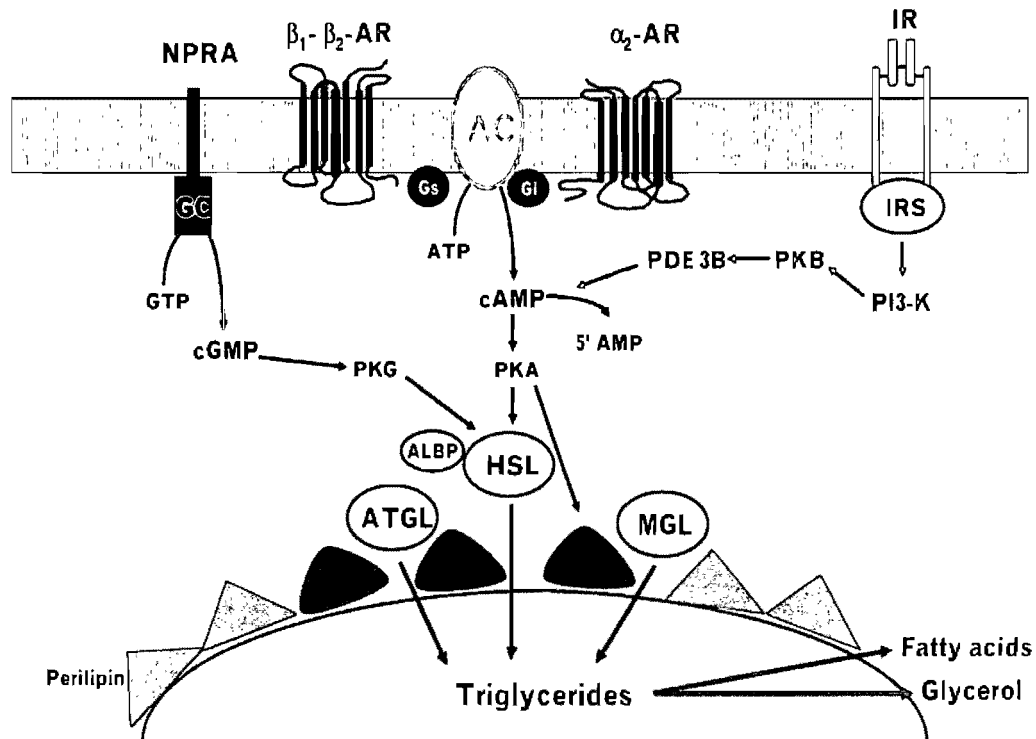


Figure 1.2 – Mécanisme de la lipolyse adipocytaire. Voir texte pour plus d'informations. AC : Adenylate Cyclase ; HSL : Hormone Sensitive Lipase ;  $\beta$ -AR : Beta-Adrenergic Receptor ; NPRA : Atrial Natriuretic Peptide Receptor ; cAMP : cyclic AMP ; AMP, Adenosine Monophosphate ; GTP : Guanidine Triphosphate ; IR : Insulin receptor ; ATGL : Adipose Triglyceride Lipase ; MGL : Monoglyceride Lipase ; PKA : Protein Kinase A ; PKG : Protein Kinase G ; PI3-K : Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase ; PDE-3B : Phosphodiesterase 3B ; ALBP : Adipocytes Lipid Binding Protein. Tiré de Arner et al. [14].

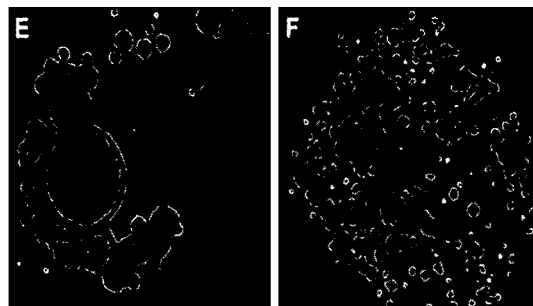


Figure 1.3 – Remodelage de la gouttelette lipidique chez des cellules 3T3-L1 par immunofluorescence. (A) Localisation de la PLIN à la surface des gouttelettes lipidiques dans les conditions basales. (B) Translocation de la PLIN de la surface de la gouttelette lipidique vers le cytosol lors d'une stimulation. Adapté de Brasaemle et al. [29].

férents dépôts adipeux [177]. De plus, Tansey et al., [264] rapportent un taux de lipolyse basale adipocytaire supérieur de  $\sim 4$  fois chez les souris *peri*<sup>-/-</sup> en comparaison aux souris *peri*<sup>+/+</sup> [264]. Lors de la lipolyse basale, les PLIN présentes sur la membrane adipocytaire agissent comme des barrières protectrices face aux lipases adipocytaires et ainsi limitent l'hydrolyse des TAG adipocytaires [32, 69]. À l'inverse lors d'une stimulation, les taux lipolytiques sont augmentés de  $\sim 30$  fois chez la souris *peri*<sup>+/+</sup> en comparaison à seulement  $\sim 3$  fois chez les souris *peri*<sup>-/-</sup> [264]. De façon similaire, l'invalidation du gène *PLIN* chez les souris génétiquement obèse *Lepr*<sup>db/db</sup> se traduit par une atténuation de la lipolyse stimulée (300 vs 800%) en comparaison aux souris normales [177]. La PLIN semble donc jouer un rôle crucial dans le contrôle adéquat de la lipolyse basale, ainsi que dans celui de la lipolyse stimulée par les hormones [69, 103]. De plus, ces résultats suggèrent une interaction entre la PLIN et une lipase lors de la stimulation de la lipolyse adipocytaire [182]. D'autre part, l'expression ectopique de PLIN par transfection virale chez des cellules 3T3-L1 entraîne une augmentation de  $\sim 6$  à 30 fois de la capacité d'emmagasiner des TAG au sein des adipocytes [32]. De plus, la surexpression de PLIN par transfection adénovirale chez les cellules 3T3-L1 ne semble pas affecter les taux de lipolyse stimulée [247].

#### *Les lipases adipocytaires*

La LHS agit sur une variété de substrats, dont les TAG, DAG et les monoacylglycérols (MAG) [21, 82, 124]. Ainsi, la LHS a longtemps été considérée comme étant la lipase unique du processus hydrolytique des TAG au niveau du tissu adipeux [124, 232]. Cependant, l'absence de la LHS n'abolit pas complètement l'activité de la lipolyse adipocytaire chez le rongeur (HSL-null) [279]. Haemmerle et al. [107] rapportent une atténuation de  $\sim 70\%$  de l'activité lipolytique stimulée *in vitro* par les catécholamines chez les souris invalidées pour le gène *LHS* et de même chez l'humain, une activité résiduelle de 50% de la lipolyse adipocytaire basale est notée lors de l'inhibition de l'activité de la LHS [14]. De plus, des études *in vitro* sur des adipocytes isolées de souris invalidées pour le gène *LHS* montrent une accumulation accrue de DAG chez ces souris en comparaison avec les souris contrôles lors de la stimulation de la lipolyse [107]. Il s'avère que l'activité hydrolytique de la LHS sur les DAG est environ dix fois plus spécifique

que son activité pour les TAG lorsque stimulée *in vitro* [14]. L'accumulation accrue de DAG chez les souris *HSL-null* montre donc que la deuxième étape de la lipolyse est majoritairement orchestrée par la LHS. Suite à ces constatations, l'existence de lipases additionnelles impliquées dans le processus d'hydrolyse des TAG adipocytaires a été suggéré. Ainsi, des études subséquentes ont permis l'identification et la caractérisation des lipases adipocytaires supplémentaires et spécifiques à chacune des étapes hydrolytiques. La lipase des TAG adipocytaires (ATGL) [297], aussi appelée desnutrin [277] ou iPLA2 [297], et la monoglycéride lipase (MGL) sont les lipases qui ont été caractérisées dans les adipocytes. Ces études montrent que l'hydrolyse séquentielle des TAG dans l'adipocyte entraîne la formation initiale de diacylglycérol (DAG) majoritairement par l'action de l'ATGL [297]. Finalement, une étude *in vitro* a montré que le retrait spécifique de la MGL altère la libération du glycérol [83]. L'hydrolyse des MAG par la MGL (libération du dernier acide gras et du glycérol) constitue la dernière étape de l'hydrolyse séquentielle des TAG adipocytaires. En outre, une lipase additionnelle, la CGI-58, semble participer au processus de la lipolyse adipocytaire. Il a été montré que la CGI-58 est co-localisée et interagit directement avec la PLIN A sur les gouttelettes lipidiques sur des cellules 3T3-L1 [257, 291]. Toutefois, le rôle précis de ces lipases demeure incertain.

### 1.1.1.2 Régulation de la lipolyse adipocytaire

La régulation de la lipolyse adipocytaire est principalement sous le contrôle des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et des concentrations plasmatiques d'insuline, également régulées par des facteurs physiologiques comme l'apport nutritionnel (jeûne et état post-prandial) et l'exercice aigu. De plus, la régulation de la lipolyse adipocytaire peut dépendre du contexte pathophysiologique (*i.e.* l'obésité et l'insulino-résistance) et de la régionalisation anatomique des tissus adipeux de l'animal ou de l'individu. La discussion qui suit portera sur les facteurs qui régulent la lipolyse adipocytaire dans différents contextes physiologiques.

#### Situations physiologiques - périodes de jeûne et post-prandiale

Lors du jeûne, les AGNE sont les principaux substrats énergétiques utilisés par les tissus périphériques et l'oxydation lipidique peut combler ~70% de la dépense éner-

gétique totale de l'organisme [156]. Ainsi, la lipolyse adipocytaire est stimulée de façon aiguë afin d'augmenter les concentrations plasmatiques d'AGNE pour répondre aux besoins énergétiques des tissus (ex. : muscles cardiaque et squelettiques, organes internes) [147]. La contribution de la lipolyse adipocytaire à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AGNE est approximativement de 80% en période de jeûne [263]. Il semble que la diminution des concentrations plasmatiques d'insuline de même que l'augmentation de celles des catécholamines contribuent à la stimulation de la lipolyse induite par le jeûne [253]. À l'inverse en période post-prandiale, l'activité de la LHS est rapidement atténuée principalement via l'augmentation des concentrations d'insuline en circulation [11, 38, 153]. Cependant, la contribution de la lipolyse adipocytaire aux concentrations d'AGNE plasmatiques demeure considérable (~60%) en période post-prandiale [263].

De façon similaire au jeûne, la libération d'AGNE est augmentée durant l'effort aigu pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme et s'effectue essentiellement par une augmentation du taux de lipolyse adipocytaire. Les concentrations d'AGNE issus de la lipolyse peut augmenter de 2 à 5 fois dans le plasma lors d'un exercice modéré [133] et jusqu'à 10 fois lors d'un effort prolongé [126] en comparaison aux concentrations plasmatiques d'AGNE mesurées au repos. Par ailleurs, l'exercice stimule la sécrétion des catécholamines qui agissent sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de l'adipocyte. Il est suggéré que la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques [13, 109] par les catécholamines, de même que la diminution du taux de sécrétion d'insuline, sont à l'origine de l'élévation des taux de lipolyse adipocytaire durant l'effort modéré [133, 286].

Outre l'influence des catécholamines et de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire, d'autres hormones et facteurs autocrines/paracrines y contribuent. Parmi ceux-ci, l'hormone de croissance (GH) et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) [48] semblent stimuler la lipolyse, alors que l'adénosine et le neuropeptide Y (NPY) auraient l'effet contraire [154, 155] (Figure. 1.4). Cependant, les connaissances du rôle spécifique de ces facteurs dans la régulation de la lipolyse demeurent limitées.

Substance	Major mechanism	Substance	Major mechanism
<b>Catecholamines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulation of lipolysis through <math>\beta</math>-ARs coupled to Gs proteins</li> <li>- Major lipolysis regulators</li> </ul>	<b>Insulin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition of lipolysis through stimulation of PDE-3,</li> <li>- Activation of protein phosphatase</li> <li>- Inhibition of adenylyl cyclase and internalisation of <math>\beta</math>-AR</li> </ul>
<b>Thyroid-stimulating hormone</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulation of lipolysis through a Gs-coupled receptor</li> <li>- Role in early infancy</li> </ul>	<b>Catecholamines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition of lipolysis through <math>\alpha</math>2-ARs</li> </ul>
<b>Glucagon, Cholecystokinin and Parathyroid hormone</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulation of lipolysis through a Gs-coupled receptor</li> <li>- Weak effects</li> </ul>	<b>Insulin-like growth factor-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uncertain physiological relevance</li> <li>- Stimulation of PIK-3/PDE-3 pathway</li> </ul>
<b>Glucocorticoids (cortisol)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permissive effects on catecholamine-induced lipolysis during short-term conditions</li> <li>- May involve a post-transcriptional upregulation of <math>\beta</math>2-AR expression</li> </ul>	<b>Adenosine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition of adenylyl cyclase through Gi-protein</li> <li>- Paracrine and autocrine agent</li> <li>- Possible regulator of basal lipolysis</li> </ul>
<b>Thyroid hormones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permissive effects on catecholamine-induced lipolysis</li> <li>- Upregulation of <math>\beta</math>2-AR expression. Inhibition of PDE-3</li> </ul>	<b>Prostaglandins E1 and E2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition of adenylyl cyclase through Gi-protein in vitro</li> <li>- Paracrine and autocrine agent</li> <li>- Possible regulator of basal lipolysis</li> </ul>
<b>Growth hormone</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permissive effects on catecholamine-induced lipolysis</li> <li>- Physiological importance in relation to nocturnal FFA availability</li> </ul>	<b>Neuropeptide Y</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition of adenylyl cyclase through Gi-protein</li> <li>- Weak effect</li> </ul>
<b>Sex steroid hormones</b>	Possible importance of testosterone in male obesity and polycystic ovarian syndrome	<b>Peptide YY</b>	Inhibition of adenylyl cyclase through Gi-protein
<b>Tumour necrosis factor-alpha</b>	Effect <i>in vitro</i>	<b>Ketone bodies</b>	Mechanisms of action unknown

Figure 1.4 – Substances stimulatrices et inhibitrices de la lipolyse adipocytaire. Tiré de Large et al. [155].

## Situations pathophysiologiques - L'obésité et l'insulino-résistance

### L'obésité

La *World Health Organisation* (WHO) estime que ~300 millions de personnes de la population mondiale sont présentement obèses (indice de masse corporelle, IMC  $>30\text{kg/m}^2$ ) et la prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter [79]. Le développement de la SHNA étant fortement associé à l'obésité [192, 204], 70-80% des patients atteints de SHNA sont obèses [70]. De façon parallèle chez le rat, l'administration d'une diète riche en lipides induit le développement de l'obésité, qui est accompagnée d'une infiltration hépatique de lipides menant à la SHNA [91].

#### *L'obésité et la lipolyse basale*

Il est rapporté que l'augmentation de l'accumulation des lipides dans les adipocytes est associée à une augmentation de la lipolyse basale, résultant en une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGNE chez les rats et chez les humains [228]. Ceci contribuerait aux détériorations métaboliques du foie [225]. Collin et al. [46] ont montré que la lipolyse basale *in vitro* du tissu viscéral est augmentée de 3 fois chez les rats nourris avec une diète riche en lipides en comparaison à des rats nourris à une diète standard durant huit semaines. De plus, ces auteurs ont noté une accumulation significative (~25%) de TAG hépatiques chez les rats soumis avec une diète riche en lipides. Similairement, des auteurs ont observé une accumulation de la masse des tissus adipeux viscéral et sous-cutané de ~30-80% de même que les taux de lipolyse basale *in vitro* des tissus viscéral et sous-cutané étaient également plus élevés de ~20-90% chez les rats soumis à une diète HF en comparaison avec des rats soumis à une diète SD [24, 202]. D'autre part chez l'humain, Lofgren et al. [171] ont rapporté un taux de lipolyse basale *in vitro* du tissu sous-cutané de la région supérieure du corps de ~76% chez les sujets obèses (IMC  $42,6 \pm 6\text{ kg/m}^2$ ) ayant un pourcentage de masse adipeuse plus élevé de ~32%, en comparaison à des sujets contrôles (IMC  $32,3 \pm 7\text{ kg/m}^2$ ). À l'inverse, une réduction de l'IMC de ~9  $\text{kg/m}^2$  chez le sujet obèse, de même qu'une diminution de ~27% de la masse adipeuse était accompagnée d'une atténuation significative (~65%) de l'activité lipolytique basale du tissu sous-cutané [171] (Fig. 1.5). Cependant, une étude récente sur la lipolyse adipocytaire basale du tissu viscéral prélevé lors de chirurgies abdominales

(chirurgies gastrique, gynécologique ou intestinale) chez les sujets obèses présente des résultats contradictoires. Dans leur étude, Cifuentes et al. [43] rapportent plutôt une diminution de la lipolyse basale *in vitro* du tissu viscéral chez les sujets obèses présentant un IMC de  $\sim 38,2 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$  en comparaison aux sujets non obèses ( $\text{IMC } 23,3 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$ ). De plus, ces auteurs ont trouvé une corrélation inverse ( $r = 0,46$ ) entre la lipolyse adipocytaire basale du tissu viscéral et l'IMC (Fig. 1.6).

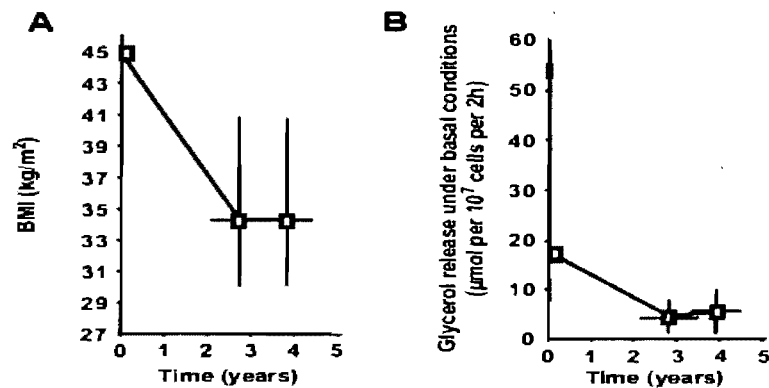


Figure 1.5 – (A) IMC ( $\text{kg/m}^2$ ) et (B) lipolyse basale du tissu sous-cutané ( $\mu\text{mol}$  glycérol /  $10^7$  cellules/2h) avant et après réduction de l'IMC chez des sujets obèses pendant un suivi de 4 ans. BMI : *Body mass Index*. Adapté de Lofgren 2005 [171].

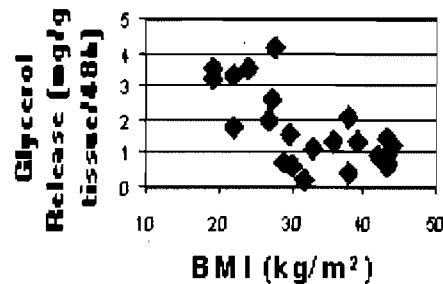


Figure 1.6 – Corrélation ( $r = 0,46$ ) entre la lipolyse basale du tissu viscéral et l'IMC ( $\text{kg/m}^2$ ). La lipolyse basale est mesurée par l'accumulation de glycérol (mg) par masse du tissu adipeux (g) dans le milieu après une incubation de 48 heures. BMI : *Body mass Index*. Adapté de Cifuentes et al. [43].

Outre la variation de la masse adipeuse, l'augmentation de la lipolyse adipocytaire basale généralement rapportée dans la littérature peut résulter de l'action d'autres facteurs tels les taux de leptine en circulation.

#### *L'obésité et la leptine*

Outre son rôle comme réservoir de lipides, l'adipocyte assure la sécrétion d'adipocytokines telle la leptine [2]. La leptine agit au niveau de l'hypothalamus où elle participe à la régulation de l'appétit et au niveau périphérique où elle intervient dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux [295]. On note une association entre l'augmentation de la sécrétion de leptine et celle de l'adiposité [47, 141, 208]. Ainsi, Lonnqvist et al. [172] ont rapporté que l'expression génétique de la leptine était de 79% plus élevée chez les individus obèses ( $IMC 40 \pm 1 \text{ kg/m}^2$ ) en comparaison aux individus non obèses ( $IMC 24 \pm 1 \text{ kg/m}^2$ ). À l'inverse, la déficience congénitale en leptine et la résistance à la leptine ont été associées à l'hyperphagie, à l'IR et à l'obésité [68, 76, 295]. Par ailleurs, l'administration périphérique de leptine, chronique [244] ou aiguë [84], augmente de 9 à 16 fois le taux d'hydrolyse des TAG adipocytaires chez les animaux. De plus, Fruhbeck et al. [85] ont montré que l'incubation d'adipocytes isolés avec de la leptine augmente la lipolyse adipocytaire et que cette stimulation est d'autant plus importante lorsque les adipocytes proviennent de souris *ob/ob* plutôt que de souris maigres [85]. Ainsi, la sur-expression du gène de la leptine dans les tissus adipeux se traduit par l'élévation des concentrations de leptine dans la circulation et peut contribuer en partie à la lipolyse basale accrue retrouvée chez l'individu obèse en comparaison au sujet non obèse.



### *L'obésité et la lipolyse stimulée*

À l'inverse du taux de lipolyse basale adipocytaire élevé, l'activité de la lipolyse stimulée par les catécholamines est atténuée dans un contexte d'obésité chez le rat et chez l'humain. Portillo et al. [202] ont observé une atténuation de la lipolyse stimulée *in vitro* chez des rats soumis à une diète riche en lipides pendant une période de sept semaines. Toutefois, Collin et al. [46] ont montré que la lipolyse stimulée *in vitro* du tissu viscéral est augmentée de 2 fois chez des rats nourris avec une diète riche en lipides en comparaison avec des rats nourris avec une diète standard durant huit semaines. Chez l'humain, une atténuation de la capacité lipolytique maximale du tissu sous-cutané de la région abdominale lors d'une stimulation *in vitro* aux catécholamines a été notée chez des femmes présentant une obésité viscérale en comparaison à des sujets non obèses (~40 vs 80%) [218]. Similairement, au niveau du tissu adipeux viscéral, Cifuentes et al. [43] ont montré que les taux de lipolyse stimulée *in vitro* mesurée par la quantité de glycérol relâché étaient ~60% plus bas chez des sujets obèses (IMC 38,2 kg/m<sup>2</sup>) en comparaison à des sujets non obèses (IMC 23,3 kg/m<sup>2</sup>) [43] (Fig. 1.7). De plus, dans l'étude de Reynisdottir et al. [218], une corrélation négative ( $r = 0,76$ ) entre l'IMC et la sensibilité de la réponse lipolytique *in vitro* aux catécholamines a été notée. Ces observations sont appuyées par des études sur la lipolyse adipocytaire *in vivo*. Notamment, Jensen et al. [134] ont rapporté une diminution de la réponse lipolytique *in vivo* (~27%) chez l'adulte obèse lors d'une infusion d'adrénaline en comparaison à des sujets non obèses (~208 ± 24 vs ~190 ± 14 pg/mol). De même, Bourgnères et al. [27] ont rapporté une augmentation de la lipolyse de seulement ~60% chez l'enfant obèse en comparaison à une augmentation de ~250% observée chez l'enfant non obèse lors d'une infusion d'adrénaline et ce, malgré les taux d'infusion d'adrénaline maintenus à ~606 ± 68 pg/ml chez l'enfant obèse en comparaison à ~396 ± 41 pg/ml chez l'enfant non obèse. De même, Stich et al. [254] ont observé que l'augmentation du taux de la lipolyse stimulée *in vivo* durant l'effort aigu était de ~19% chez le sujet obèse en comparaison à ~172% chez le sujet non obèse (Fig. 1.8).

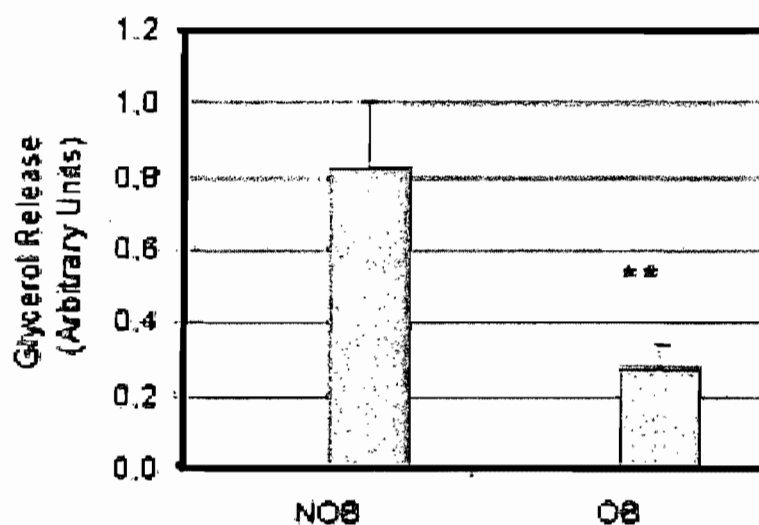


Figure 1.7 – Lipolyse stimulée mesurée par la relâche de glycérol (unités arbitraires) par des adipocytes isolés du tissu viscéral chez des sujets obèses (OB) et non obèses (NOB). Adapté de Cifuentes et al. [43].

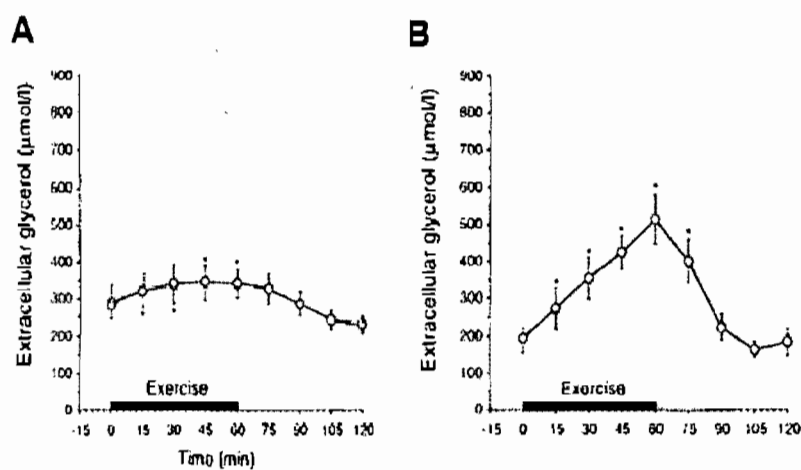


Figure 1.8 – Taux d'augmentation de la lipolyse stimulée *in vivo* mesurée par les concentrations de glycérol extracellulaires ( $\mu\text{mol/L}$ ) lors de l'effort aigu chez des sujets obèses (A) et des sujets non obèses (B). Tiré de Stich et al. [254].

À l'inverse, une perte de poids se traduit par une augmentation de la lipolyse stimulée du tissu sous-cutané abdominal chez le sujet obèse lors de l'effort aigu [255]. Les auteurs de cette étude ont montré que cette augmentation semble être reliée à la diminution de l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques.

### **L'insulino-résistance**

Normalement, l'insuline exerce son effet anti-lipolytique en activant le récepteur à l'insuline présent à la surface des adipocytes (Fig. 1.2), ce qui réduit la lipolyse et donc la relâche d'AGNE plasmatiques. Cependant, dans une condition d'insulino-résistance (IR), l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire est altérée [263]. Par conséquent, on observe une augmentation du taux de lipolyse adipocytaire et du flux d'AGNE plasmatique disponibles pour le foie [35, 263] (Fig. 1.9).

L'IR tient un rôle central dans la pathogenèse de la SHNA [45, 157, 193]. Le *two-hit model* de Day et James [54] a été proposé afin d'expliquer le développement d'une SHNA primaire. L'accumulation de lipides dans les hépatocytes, menant au développement de la simple stéatose et progressant ensuite vers la stéatohépatite accompagnée de l'IR caractérisent la première phase (*first hit*) de ce modèle. L'insuline serait potentiellement en cause lors du *first hit* et rendrait le foie plus susceptible aux agressions ultérieures, ou *second hit*, parmi lesquels on retrouve l'inflammation, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les hormones dérivées du tissu adipeux.

Il a été montré que certaines fonctions métaboliques associées à la sensibilité à l'insuline sont altérées au sein d'adipocytes hypertrophiés chez l'animal et chez l'humain obèses [10, 25, 292]. Stevens et al. [252] ont observé une atténuation de l'effet anti-lipolytique de l'insuline chez le rat obèse *ob/ob*, de même que chez le sujet présentant une obésité centrale en période post-prandiale. De plus, Johnson et al. [137] ont rapporté une association entre l'augmentation du tissu viscéral et la diminution de la sensibilité à l'effet antilipolytique de l'insuline du tissu sous-cutané des régions abdominale et gluteale.

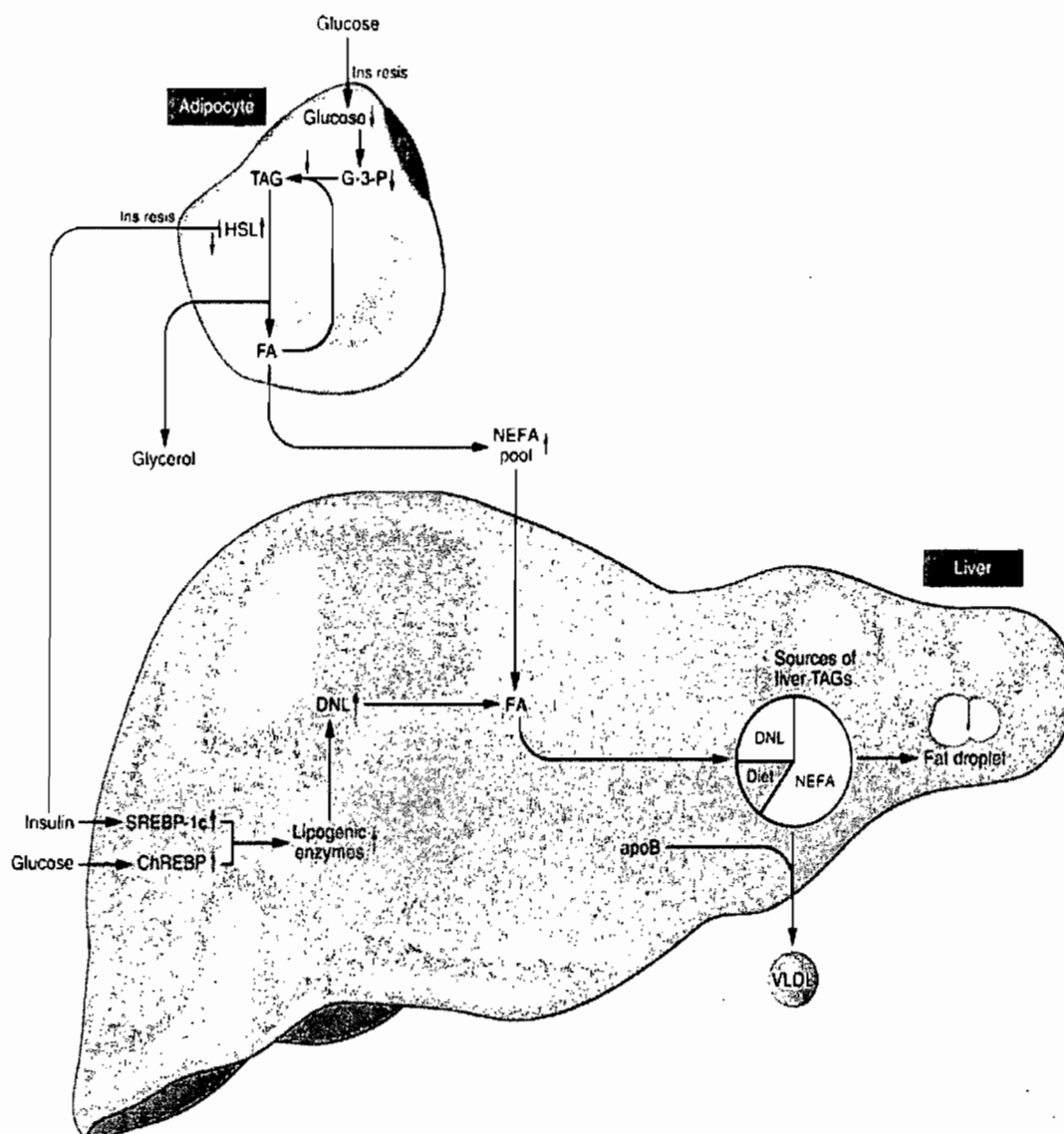


Figure 1.9 – Métabolisme des lipides dans un contexte de SHNA. La résistance à l'insuline cause une incapacité de l'insuline à inhiber l'activité de la lipase hormono-sensible (HSL) et d'une augmentation de la relâche d'AGNE des adipocytes, ce qui résulte en une augmentation de l'arrivée des AGNES au foie. DNL, lipogenèse *de novo* ; NEFA, acides gras non estérifiés ; G-3-P, glucose-3-phosphate ; SREBP-1c, *Sterol Regulatory Binding Protein-1c* ; ChREBP, *Carbohydrate Response Element Binding Protein*. Adapté de Tamura et al. [263].

Fabbrini et al. [75] ont réalisé une étude ayant pour but de déterminer si la sensibilité adipocytaire à l'insuline et l'activité lipolytique étaient altérées chez des adolescents obèses (IMC  $36,5 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ ) atteints de SHNA (>10% du volume hépatique). Cette étude a montré que la lipolyse globale mesurée *in vivo* par le taux de relâche basal du palmitate dans le plasma était supérieure chez les sujets atteints de la SHNA ( $127 \pm 13$  vs  $87 \pm 7 \text{ } \mu\text{mol}$  palmitate /min) et ce, même lors d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique ( $44 \pm 8$  vs  $24 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol}$  palmitate /min) en comparaison à des sujets ayant un contenu normal en TAG intrahépatiques (Fig. 1.10). Ces résultats montrent que l'activité lipolytique adipocytaire est augmentée chez les adolescents atteints de SHNA et soutiennent l'hypothèse de l'implication de l'insulino-résistance de l'adipocyte dans la pathogenèse de la SHNA.

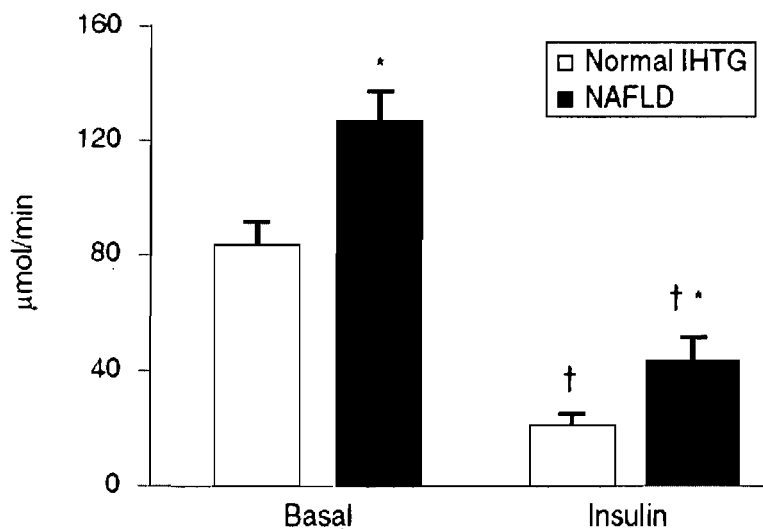


Figure 1.10 – Le taux de relâche basal du palmitate marqué ( $\mu\text{mol/min}$ ) et lors d'un clamp chez les adolescents obèses avec SHNA (bandes noires) ou sans SHNA (bandes blanches). IHTG : *Intrahepatic Triglyceride*. Tiré de Fabbrini et al. [75].

À l'inverse, une normalisation de la sensibilité à l'insuline du tissu sous-cutané abdominal a été notée avec une perte de masse adipeuse chez des sujets obèses (IMC  $\sim 30$ -50 kg/m<sup>2</sup>) en comparaison à des sujets non obèses (IMC  $\sim 21$ -29 kg/m<sup>2</sup>) [171]. De plus, la perte de masse adipeuse était accompagnée d'une diminution des concentrations plasmatiques d'AGNE de  $\sim 18\%$  chez des sujets obèses [171]. Par conséquent, l'augmentation de la sensibilité de l'adipocyte à l'action de l'insuline peut contribuer à la diminution du taux de lipolyse basale et des concentrations plasmatiques d'AGNE retrouvées après une perte de masse grasse chez des sujets obèses.

### **Régionalisation**

La régulation de la lipolyse adipocytaire diffère selon le site anatomique du dépôt adipeux de l'organisme. Il a été rapporté que le taux de lipolyse adipocytaire du dépôt adipeux de la région abdominale du corps est supérieur à celui des dépôts adipeux des membres inférieurs [125]. La variation des taux lipolytiques adipocytaires est principalement attribuée aux différences régionales dans la fonction et la densité des récepteurs  $\beta$ - et  $\alpha$ - adrénergiques des dépôts adipeux, de même qu'aux différences régionales de l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire [125]. En effet, les résultats d'études *in vitro* indiquent que la sensibilité aux catécholamines des différents dépôts adipeux pour la lipolyse est décroissante, allant du dépôt intra-abdominal où elle est la plus élevée au dépôt sous-cutané de la région glutéale où elle est la plus faible, en passant par le dépôt sous-cutané de la région abdominale (Tableau. 1.I). De plus, Arner et al. [12] ont rapporté que l'expression des récepteurs  $\beta 1$ - et  $\beta 2$ - adrénergiques ainsi que l'affinité de ces récepteurs pour les catécholamines sont plus élevées au niveau du tissu adipeux sous-cutané abdominal en comparaison à celui de la région glutéale.

Tableau 1.I – La régulation lipolytique *in vitro* par la régionalisation. Tiré de Horowitz et al. [125].

Receptor	Activating hormones	Effect on lipolysis	Effect on regional lipolysis
$\beta 1$ , $\beta 2$ , $\beta 3$	Epi, NE	+	Intra-abdominal >abdominal subcutaneous >femoral subcutaneous
$\alpha 2$	Epi, NE	-	Femoral subcutaneous >abdominal subcutaneous >intra-abdominal
Insuline	insulin	-	Subcutaneous >intra-abdominal

### **Stratégies thérapeutiques**

Il n'y a aucun traitement mandaté pour soigner une SHNA. La thérapie focalise sur le traitement des facteurs de risques établis (ex. : obésité et insulino-résistance) qui peuvent endommager le foie [106] plutôt que sur les paramètres sous-jacents la pathophysiologie du développement d'une SHNA. Les traitements axés sur les facteurs de risque comptent notamment : la perte de poids, la pharmacologie, certaines procédures chirurgicales et l'entraînement physique [271].

#### **1.1.2 Entraînement physique et lipolyse adipocytaire**

L'entraînement physique est recommandé afin de prévenir ou de traiter la SHNA [259], dû à sa contribution à la diminution de l'adiposité [89, 90] et à la réduction des concentrations d'AGNE du plasma [158]. Les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur ces facteurs extra-hépatiques impliqués dans le développement de la SHNA peuvent être associés à une meilleure régulation de la lipolyse adipocytaire.

À notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée à l'étude de l'effet de l'entraînement physique sur la lipolyse adipocytaire du tissu adipeux viscéral chez l'humain pour des raisons éthiques. Il semble que l'obésité, surtout de type central [88, 130] soit un facteur de risque pour le développement de la SHNA. En effet, on retrouve un taux de prévalence de la SHNA de ~10-15% chez les individus non obèses mais présentant une obésité centrale [70]. L'augmentation de la masse de ce dépôt adipeux amène une mobilisation des acides gras vers le foie via la veine porte due à un "effet-masse" du tissu adipeux qui libère davantage d'acides gras. Selon l'hypothèse de la veine porte, les AGNE issus du tissu adipeux viscéral sont facilement acheminés au foie par la circulation portale dû à l'augmentation de l'accessibilité vers la veine porte, faisant en sorte que le tissu adipeux viscéral peut contribuer de façon importante au développement de pathologies telle la SHNA.

La majorité des études qui se sont penchées sur l'effet de l'entraînement sur la lipolyse adipocytaire (basale et stimulée) datent pour la plupart de plus de 10 ans et rapportent des résultats contradictoires. La synthèse des détails expérimentaux et des résultats de ces études sont présentés au Tableau. 1.II. La plupart des résultats présentés dans



ce tableau proviennent d'études *in vitro* chez le rat et chez l'humain, et ont été réalisées sur les tissus adipeux épидидymaire et sous-cutané.

En somme, chez le rat, seulement deux études ont évalué la lipolyse adipocytaire du tissu intra-abdominal suite à un programme d'entraînement en natation [72, 270], alors que la majorité des autres études chez les rats ont examiné l'effet d'un entraînement physique sur la lipolyse adipocytaire du tissu adipeux épидидymaire en comparaison à des animaux sédentaires [15, 16, 36, 132, 179, 194, 196, 270]. Chez l'humain, toutes les études ont évalué la lipolyse adipocytaire du tissu sous-cutané abdominal chez des athlètes [50–52, 55, 63, 145, 146, 178, 219, 251] et chez des sujets entraînés [59–63, 201] en comparaison à des sujets sédentaires. D'autre part, chez l'humain une seule étude s'est penchée sur l'effet de l'entraînement physique sur la lipolyse adipocytaire chez le sujet obèse, et dans cette étude le tissu sous-cutané abdominal a été analysé [55].

Tableau 1.II – Tableau synthèse des études sur l'effet de l'entraînement sur la lipolyse adipocytaire (basale et stimulée).

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Askew et al. (1975) [16]	Rats Wistar Mâles	Course sur tapis roulant, 13 semaines	Épididymaire	In vitro - ueq FFA /h /g dépôt adipeux umol glycerol /h /10 <sup>6</sup> cellules	N/A	↑  ↑
Askew et al. (1976)[15]	Rats Mâles	Course sur tapis roulant, 12 semaines	Épididymaire	In vitro - umol glycerol /h /10 <sup>6</sup> cellules ueq FFA /h /g dépôt adipeux	N/A	↑  ↑
McGarr et al. (1976)[179]	Rats Wistar Mâles	Course sur tapis roulant, 12 semaines	Épididymaire	In vitro - umol glycerol /h /10 <sup>6</sup> cellules umol glycerol /h / g dépôt adipeux	↔  ↑	↔  ↑
suite à la page suivante						

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Owens et al. (1977) [196]	Rats Long Evans Mâles	Course sur tapis roulant, 12 semaines	Épididymaire	In vitro - umol glycerol /h /10 <sup>7</sup> cellules	↓	↑
Bukowiecki et al. (1980)[36]	Rats Wistar Mâles Femelles	Natation, 7 à 11 semaines	Épididymaire Uro-génital	In vitro - umol glycerol /15min /10 <sup>6</sup> cellules	↔ ↑	↑ ↑
Oscai et al. (1981) [194]	Rats Wistar Mâles	Course sur tapis roulant, 12 semaines	Épididymaire	In vitro - umol glycerol /h /10 <sup>6</sup> cellules	↔	↔
Shepherd et al. (1986) [236]	Rats Sprague-Dawley Femelles	Course sur tapis roulant, 16 semaines	Périrénal Uro-génital	In vitro - nmol glycerol /h /10 <sup>6</sup> cellules	↔	↑

*suite à la page suivante*

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Toode et al. (1993) [270]	Rats Wistar Mâles	Natation, progressif sur 6 sem, 45 à 180 min	Sous-cutané	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↔	↔
Izawa et al. (1994) [132]	Rats Wistar Mâles	Course sur tapis roulant, 9 semaines	Épididymaire	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↑	↑
Enevolsden et al. (2000) [72]	Rats Wistar Femelles	Natation, progressif sur 10 sem	Mésentérique ; Rétropéritonéal ; Urogénital ; Sous-cutané	In situ par microdialyse - [uM glycérol] interstielle	NA	↑
<i>suite à la page suivante</i>						

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Després et al. (1984) [62]	Hommes Femmes	Ergocycle, 20 semaines	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↔  ↔	↑  ↔
Després et al. (1984) [61]	Hommes Femmes	Ergocycle, 20 semaines	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↔  ↔	↑  ↑
Després et al. (1984) [59]	Mixte (hommes et femmes)	Ergocycle, 20 semaines	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↑	↑
Després et al. (1984) [63]	Hommes	Ergocycle, 20 semaines  Athlètes (marathon)	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↑  ↑	↑  ↑
<i>suite à la page suivante</i>						

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Crampes et al. (1986) [50]	Hommes	Athlètes (marathon)	Sous-cutané, Région abdominale	In vitro - umol glycérol / h / g tissu adipeux	↔	↑
Poehlman et al. (1987) [201]	Hommes	Ergocycle, 3 semaines	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycérol cellules	↔	↔
Crampes et al. (1989) [52]	Mixte	Athlètes (course longue distance)	Sous-cutané, Région abdominale	In vitro - umol glycérol / h / g tissu adipeux	↔	↑
Rivière et al. (1989) [219]	Femmes	Athlètes (course longue distance)	Sous-cutané, Région abdominale	In vitro - umol glycérol / h / g tissu adipeux	↓	↑
<i>suite à la page suivante</i>						

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
Toode et al. (1993) [270]	Hommes	Athlètes (course longue distance)	Sous-cutané, Région gluteale	In vitro - umol glycerol /30 min /10 <sup>6</sup> cellules	↓	↑
Stallknecht 1995[251]	Hommes	Sujets entraînés en endurance	Sous-cutané, Région abdominale	In situ (microdialyse) - [uM glycérol] interstielle	NA	↔
Klein et al. (1996) [146]	Hommes	Athlètes (en endurance)		In vivo - [2H <sup>5</sup> ] Glycérol; mesure du taux d'apparition de glycérol (Ra)	NA	↑
Mauriège et al. (1997) [178]	Femmes	Athlètes en endurance (ski de fond et course longue distance)	Sous-cutané; Région abdominale	In vitro - surface adipocytaire (um <sup>2</sup> X 10 <sup>8</sup> X 2h )  umol glycérol /2h /10 <sup>6</sup> cellules surface adipocytaire (um <sup>2</sup> X 10 <sup>8</sup> X 2h ) umol glycérol /2h /10 <sup>6</sup> cellules	↑  ↔	↑  ↔
<i>suite à la page suivante</i>						

*suite de la page précédente*

Auteurs	Modèle	Traitement	Tissus	Méthode et expression de la lipolyse adipocytaire	Taux de lipolyse adipocytaire	
					Basale	Stimulée
De Gliszinski et al. (1998) [55]	Hommes (obèses)	Ergocycle, 12 semaines	Sous-cutané, Région abdominale	In vitro - umol glycérol / h / g tissu adipeux	↓	↑



### *Entraînement et lipolyse basale*

La plupart des études conduites chez le rat comme chez l'humain ne rapportent aucun changement de la lipolyse basale exprimée par nombre d'adipocyte ou par masse de tissu adipeux avec l'entraînement physique [36, 50, 52, 61, 62, 179, 194, 194, 236]. Toutefois quelques études ont trouvé des variations de la lipolyse adipocytaire basale (exprimée par nombre d'adipocytes ou par masse de tissu adipeux) en réponse à un entraînement.

Par exemple, Owens et al. [196] ont rapporté une diminution de la lipolyse basale *in vitro* normalisée par le nombre d'adipocytes au niveau du tissu épидидymaire chez des rats entraînés en comparaison à des rats sédentaires ( $0,47 \pm 0,13$  vs  $0,13 \pm 0,08$   $\mu\text{mol glycérol}/10^7\text{cellules/h}$ ). Également, De Glisezinski et al. [55] ont montré qu'un programme d'entraînement d'une durée de trois mois diminue la lipolyse basale *in vitro* au niveau du tissu sous-cutané abdominal ( $2.5 \pm 0.5$  vs  $1.3 \pm 0.2$   $\mu\text{mol glycérol}/100\text{mg}$  de tissu adipeux) chez des sujets obèses. Chez l'humain, Toode et al. [270] ont montré que le taux de lipolyse basale *in vitro* du tissu adipeux sous-cutané chez des athlètes en endurance de haut niveau correspondait environ à la moitié de celui retrouvé chez des sujets non entraînés. Ces observations sont appuyées par Rivière et al. [219] qui ont rapporté un taux lipolytique basal *in vitro* du tissu sous-cutané inférieur chez des athlètes en endurance en comparaison à des sujets non entraînés ( $0,184 \pm 0,075$  vs  $0,403 \pm 0,075$   $\mu\text{mol glycérol}/100\text{mg}$  de lipides).

Puisqu'une relation étroite entre la lipolyse adipocytaire basale et la masse adipeuse (voir section *L'obésité et lipolyse basale*) a été observée dans un contexte d'obésité, la diminution de la masse adipeuse peut être à l'origine de la diminution de l'activité lipolytique basale observée suite à un programme d'entraînement chez les animaux et chez les humains. Ainsi, la diminution des taux de lipolyse adipocytaire basale avec l'entraînement physique rapportée dans les études de De Glisezinsky et al. [55], Toode et al. [270] et Rivière et al. [219] était accompagnée d'une diminution significative de l'adiposité chez ces sujets et ces animaux.

Cependant, d'autres études ont rapporté des résultats contradictoires. Notamment, Bukowiecki et al. [36] ont montré qu'un programme d'entraînement physique en natation de 7 à 11 semaines diminuait la masse adipeuse épидидymaire de moitié accompa-

gnée d'une augmentation de la lipolyse basale *in vitro* de ce tissu ( $\mu\text{mol}$  glycérol / 15 minutes /  $10^6$  cellules). Ces observations sont supportées par les résultats d'une étude conduite par McGarr et al. [179] qui ont noté une augmentation de la lipolyse adipocytaire basale *in vitro* exprimée par masse de tissu adipeux ( $3,41 \pm 0,65$  vs  $1,81 \pm 0,21$   $\mu\text{mol}$  glycérol / h / g épидидymaire) au niveau du tissu adipeux épидидymaire, accompagnée d'une diminution de 36% de la masse du tissu épидидymaire suite à un entraînement de 12 semaines de course sur tapis roulant chez des rats en comparaison à des rats sédentaires (Tableau 1.II). De plus, Mauriège et al. [178] ont montré une augmentation de la lipolyse basale exprimée soit par nombre d'adipocytes ( $0,7 \pm 0,1$  vs  $0,4 \pm 0,1$   $\mu\text{mol}$  glycérol /  $10^6$  cellules / 2h) ou normalisée par surface d'adipocyte ( $3,4 \pm 0,4$  vs  $2,2 \pm 0,5$  nmol glycérol /  $\mu\text{m}^2$  /  $10^8$  cellules / 2h) au niveau du tissu sous-cutané abdominal chez des athlètes présentant un pourcentage d'adiposité corporelle inférieur à celui mesuré chez des sujets sédentaires (20 vs 27%). D'autre part, Després et al. [63] ont noté une augmentation de la lipolyse adipocytaire basale *in vitro* au niveau du tissu sous-cutané chez des athlètes et chez des sujets soumis à un programme d'entraînement sur ergocycle en comparaison à des sujets sédentaires, malgré un pourcentage d'adiposité inférieur mesuré chez les athlètes et les sujets entraînés en comparaison aux sujets sédentaires (10,7 vs 13,2 vs 15,4%, respectivement).

#### *Entraînement et lipolyse stimulée*

La plupart des études *in vitro* rapportent une augmentation de la réponse lipolytique par stimulation aux catécholamines chez des sujets entraînés (rats ou humains) en comparaison aux sujets non entraînés [50, 52, 270]. Le même phénomène est aussi reproduit chez les sujets obèses. En effet dans leur étude, DeGlisezinsky et al. [55], ont rapporté une augmentation de ~62% de la lipolyse stimulée aux catécholamines du tissu sous-cutané chez des sujets obèses ( $\text{IMC } 36,9 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$ ) suite à un entraînement de 12 semaines sur ergocycle. Ces auteurs suggèrent que l'augmentation de la réponse lipolytique à l'effort aigu chez les sujets entraînés semble résulter de l'augmentation de l'efficacité des voies  $\beta$ -adrénergiques et d'une diminution de l'efficacité de la voie  $\alpha$ -adrénergique [52, 55].

Cependant, d'autres études n'ont rapporté aucun changement de l'activité lipolytique

adipocytaire en réponse à un programme d'entraînement [127, 179, 194].

Il y a plusieurs raisons à l'origine des discordances entre les résultats des études mentionnées précédemment. Les concentrations supraphysiologiques de catécholamines utilisées dans les études mentionnées précédemment semblent jouer un rôle important dans la discordance entre les résultats rapportées. En effet, une augmentation marquée de la lipolyse stimulée à l'aide de concentrations supraphysiologiques d'adrénaline ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  mol/L) est obtenue sur des adipocytes issus de sujets entraînés en comparaison à des adipocytes issues de sujets non entraînés [50, 52, 63, 219]. Toutefois, Crampes et al. [50, 52] rapportent que l'activité lipolytique est semblable ou légèrement diminuée sur des adipocytes issus de sujets entraînés en endurance lorsque les cellules sont exposées à des concentrations physiologiques de catécholamines ( $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  mol/L).

En plus des concentrations supraphysiologiques utilisées, un certain nombre d'autres facteurs peuvent être impliqués dans les discordances. Notamment, le choix des méthodes utilisées pour mesurer le taux de la lipolyse adipocytaire globale ou régionale (*in vivo* vs *in vitro*), la différence régionale au niveau des tissus analysés, ainsi que l'unité d'expression du taux lipolytique (*i.e.* exprimé par nombre d'adipocytes, par unité de masse adipeuse et par unité de surface adipocytaire). De plus, les discordances notées au niveau des effets de l'entraînement sur la réponse lipolytique pourraient être reliées au choix du programme d'entraînement physique (*i.e.* durée, intensité). Le recours à des protocoles d'expérimentation standardisés est requis avant de pouvoir conclure fermement sur les effets de l'entraînement physique pour la lipolyse adipocytaire.

En somme, l'entraînement physique s'avère efficace pour influencer certains facteurs extrahépatiques pouvant contribuer à une meilleure régulation de la lipolyse adipocytaire, tels la sensibilité à l'insuline, la fonction des voies adrénergiques et des paramètres au niveau post-récepteur adrénergique (*i.e.* cascade enzymatique de la lipolyse adipocytaire). Chez les rats obèses (*fa/fa*) et les rats soumis à une diète riche en lipides, un programme d'entraînement accélère le taux de disparition du glucose mesuré lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique en comparaison à des rats contrôles [120, 143]. De plus, Hickner et al. [121] ont rapporté une diminution des taux d'apparition du glycérol lors d'une infusion d'insuline suite à un entraînement de deux se-

maines chez des sujets obèses. De même, un programme d'entraînement en natation a amélioré l'effet supprimeur qu'exerce l'insuline sur les concentrations plasmatiques d'AGNE [158]. En effet, une infusion d'insuline a atténué de ~60% les concentrations d'AGNE plasmatiques chez des rats entraînés en comparaison à 27% chez des rats sédentaires [158].

D'autre part, Crampes et al. ont montré que l'augmentation de la réponse lipolytique aux catécholamines chez les sujets entraînés semble résulter de l'augmentation de l'efficacité des voies  $\beta$ -adrénergiques (lipolytiques) et d'une diminution de l'efficacité de la voie  $\alpha$ -adrénergique (antilipolytique) [52]. En somme, ces résultats suggèrent que l'entraînement physique améliore la sensibilité périphérique à l'insuline et par ce fait, l'augmentation de l'effet antilipolytique de l'insuline contribue à la diminution des taux d'AGNE plasmatiques.

Finalement au niveau des lipases adipocytaires, Enevolsden et al. [73] ont rapporté une augmentation de l'expression protéique et de l'activité de la LHS du tissu intra-abdominal (rétropéritonéal) à la suite d'un programme d'entraînement de 18 semaines en natation chez les rats.

Toutefois, il n'existe aucune étude ayant été conduite chez l'humain dans le but de comprendre si les effets de l'entraînement physique sur la lipolyse adipocytaire seraient reliés au contenu protéique de la PLIN des tissus intra-abdominaux.

### **1.1.3 La lipogenèse *de novo* hépatique**

#### **1.1.3.1 Mécanisme de la lipogenèse *de novo* hépatique**

La lipogenèse *de novo* hépatique est le processus métabolique de la synthèse des acides gras. Chez les mammifères, la source principale de carbones nécessaires à la biosynthèse d'acides gras provient de l'acétyl CoA formé à partir du citrate issu du cycle de Krebs. L'enzyme acétyl CoA carboxylase (ACC) catalyse la formation du malonyl CoA à partir de l'acétyl CoA. Par la suite, ce précurseur est graduellement allongé de deux carbones à la fois par l'activité de l'enzyme *fatty acid synthase* (FAS). Dans la plupart des cas, le processus de la lipogenèse *de novo* forme des acides gras à plus ou moins

longues chaînes (généralement acides gras composés de 16 ou 18 carbones), qui par la suite peuvent subir une variété de modifications (*i.e.* élongation et désaturation) donnant lieu à différents types d'acides gras assurant diverses fonctions au sein de l'organisme [203]. (Fig. 1.11).

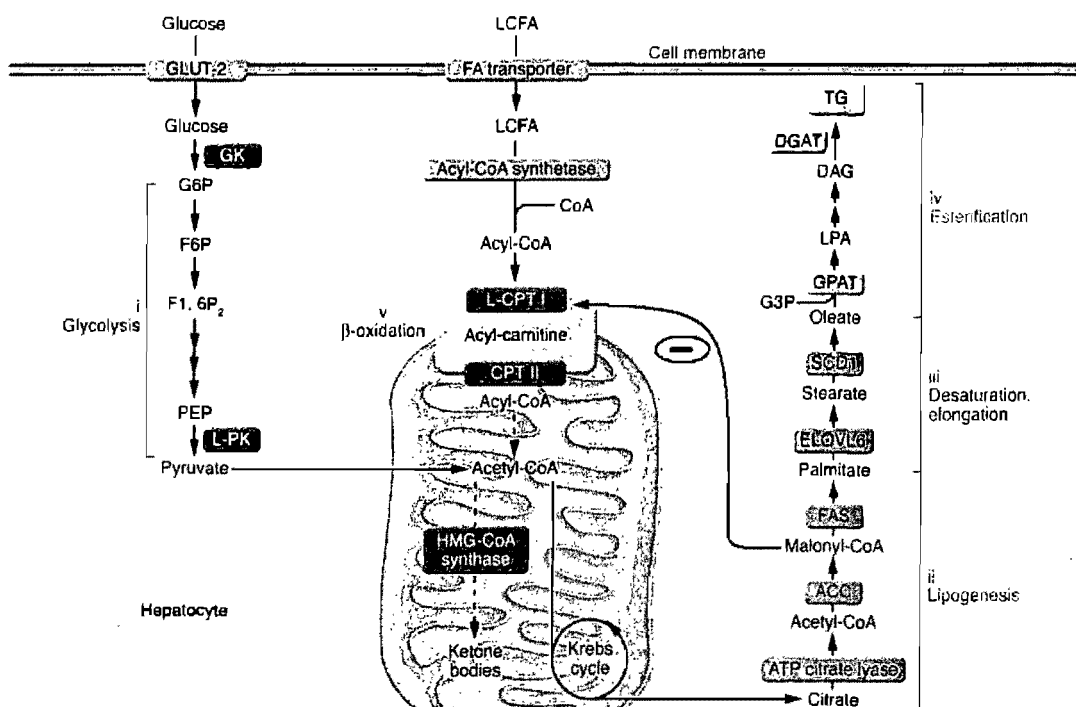


Figure 1.11 – Voie de la lipogenèse *de novo*. GK : glucokinase; F6P, fructose 6-phosphate; F-1,6-P<sub>2</sub>, fructose 1,6 diphosphate; G3P, glycérol 3-phosphate; G6P, glucose 6-phosphatase; PEP, phosphoénol pyruvate; LCFA, *long-chain fatty acids*; CPT II, *carnitine palmitoyltransferase II*; ELOVL6, *long-chain elongase*; SCD-1, stéaroyl CoA désaturase-1; ACC, acétyl-CoA carboxylase; FAS, *fatty acid synthase*; GPAT, glycérol 3-phosphate acyltransférase; DGAT, diacylglycérol acyltransférase; L-CPT I, *liver carnitine palmitoyltransferase I*. L-PK, *liver-pyruvate kinase*. Adapté de Postic et al. [203].

### 1.1.3.2 Régulation de la lipogenèse *de novo*

La régulation de la lipogenèse *de novo* hépatique implique des facteurs nutritionnels, hormonaux et génétiques. En période post-prandiale, la contribution de la lipogenèse *de novo* hépatique à la formation de TAG hépatiques n'est que ~5% chez des sujets sains [65, 268] et peut augmenter jusqu'à 23% en période de jeûne [268]. Toutefois chez les sujets SHNA, la contribution en période post-prandiale est plus élevée (~15-25%) [65, 67] en comparaison à des sujets témoins, et n'augmente guère en période de jeûne [268]. Ces évidences suggèrent que la lipogenèse *de novo* hépatique est plus importante chez les sujets SHNA. D'ailleurs une altération dans la régulation de cette voie métabolique est présente chez les sujets SHNA.

Dans leur étude, Schwarz et al. [233] rapportent que la contribution des AGNE provenant de la synthèse *de novo* à la formation de TAG hépatiques était 4 fois plus élevée chez les sujets SHNA et hyperinsulinémiques, en comparaison aux sujets sains. De ce fait, l'insuline semble jouer un rôle central dans la régulation de la lipogenèse *de novo*, et donc une altération dans la régulation de l'insuline sur cette voie peut contribuer au développement de la SHNA.

Les études conduites chez le rongeur ont permis d'élucider le rôle potentiel de l'insuline dans la régulation des mécanismes moléculaires de la lipogenèse *de novo* hépatique chez les patients SHNA. Les résultats de ces recherches ont rapporté que la stimulation de la lipogenèse *de novo* résulte entre autres de l'activation des facteurs de transcription, le *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) et le *carbohydrate response element binding* (ChREBP) et qu'une accumulation de TAG peut être notée lorsqu'une ou ces deux voies de transcription est anormale.

Trois isoformes de SREBP existent, SREBP-1a, -1c, et -2. SREBP-2 semble davantage jouer un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol [34], tandis que SREBP-1 régule les gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras [240]. Au niveau du foie, l'expression de l'isoforme SREBP1-c prédomine. La surexpression de SREBP1-c induit l'expression des gènes lipogéniques (FAS et ACC) dans les hépatocytes en culture de même que chez le foie de souris [144, 238, 241], favo-

risant le développement de la stéatose hépatique [238, 241]. À l'inverse, une altération de l'expression des gènes lipogéniques est retrouvée chez les souris invalidées du gène SREBP1-c [164].

Foretz et al. [78] ont montré que la transcription de SREBP1-c est rapidement stimulée par l'insuline chez les hépatocytes en culture. Cette évidence suggère fortement l'existence d'une voie d'activation de l'expression des gènes lipogéniques par l'insuline [128]. Par ailleurs, on retrouve une lipogenèse *de novo* hépatique élevée dans des situations pathologiques d'insulino-résistance tels l'obésité [66] et le diabète de type 2 [77]. Il est paradoxal de constater que la lipogenèse *de novo* est élevée en situation d'insulino-résistance. Les taux élevés d'insuline généralement retrouvés chez les souris insulino-résistantes sont accompagnés des taux élevés de SREBP1-c [239, 269] et de ce fait peuvent contribuer aux taux élevés de lipogenèse *de novo* retrouvés en situation de résistance à l'insuline.

Outre le SREBP, le facteur de transcription ChREBP principalement régulé par le glucose est localisé dans le cytosol des cellules dans des conditions basales. L'activation de ChREBP est induite par des concentrations élevées de glucose se traduisant par une translocation rapide du cytosol vers le noyau afin d'augmenter la transcription de gènes glycolytiques (*liver pyruvate kinase*, L-PK) et lipogénique (ACC) [58] (Fig. 1.12). La génération de souris invalidées pour le gène *ChREBP* a permis l'étude du rôle de ChREBP dans l'activation de la lipogenèse *de novo*. Dentin et al. [57] ont rapporté une diminution de la lipogenèse *de novo* hépatique chez les souris *ChREBP*<sup>-/-</sup> accompagnée d'une diminution du contenu de TAG hépatiques et circulants.

De ce fait, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie souvent retrouvées dans un contexte de SHNA, et de leur effet sur SREBP-1c et ChREBP, respectivement [98] sont donc susceptibles d'induire une augmentation anormale de l'activité lipogénique et de contribuer au développement de la SHNA.

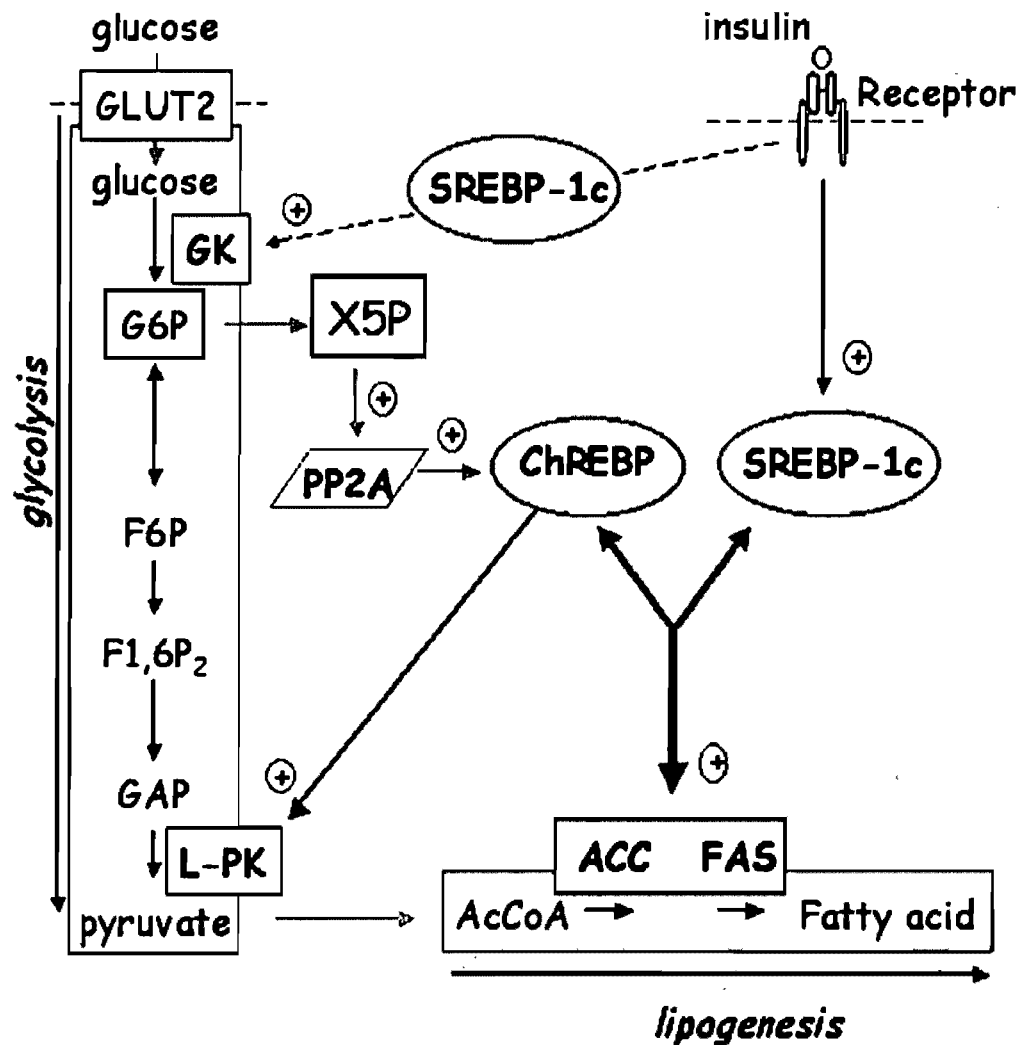


Figure 1.12 – Activité synergique des facteurs de transcription SREBP1-c et de ChREBP dans l'expression des gènes lipogéniques et glycolytiques. SREBP1-c est stimulé par la liaison de l'insuline à son récepteur. ChREBP est activé par des concentrations élevées en glucose. GLUT2, glucose transporter 2 ; GK, glucokinase ; F6P, fructose 6-phosphate ; F-1,6-P<sub>2</sub>, fructose 1,6 diphosphate ; G6P, glucose 6-phosphatase ; ACC, acétyl-CoA carboxylase ; FAS, fatty acid synthase ; X5P, xylulose-5-phosphate ; PP2A, protein phosphatase 2A ; L-PK, liver-pyruvate kinase. Tiré de Dentin et al. [58].



## 1.2 Voie d'élimination des lipides hépatiques

### 1.2.1 L'oxydation des lipides hépatiques

L'oxydation des lipides hépatiques peut se produire par deux voies : la  $\beta$ -oxydation au sein des mitochondries et des peroxysomes, et la  $\omega$ -oxydation effectuée par les membres de la superfamille des cytochromes P450 au sein des microsomes [209, 215]. Dans des conditions normales, la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie est la voie prédominante de l'oxydation des acides gras [189].

#### 1.2.1.1 La bêta-oxydation mitochondriale des lipides hépatiques

Les hépatocytes sont normalement riches en mitochondries, chaque hépatocyte contenant  $\sim 800$  mitochondries, qui représentent  $\sim 18\%$  du volume total du foie [281].

La première étape menant à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des AGNE est celle de leur activation par l'ajout d'un coenzyme A (CoA) par l'action de l'enzyme acyl-CoA synthétase. Ensuite, les AGNE à courtes (C8) et moyennes (C8-12) chaînes pénètrent librement dans la mitochondrie, tandis que l'entrée des acides gras à longues chaînes (C12-20) est orchestrée par l'activité de l'enzyme carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT-1), qui est sous la régulation stricte du malonyl-CoA (Fig. 1.13).

Outre le fait que le malonyl-CoA est le premier substrat dans le processus de la synthèse des lipides (Fig. 1.11), ce dernier joue un aussi rôle important dans le métabolisme de lipides hépatiques. Entre autres, des concentrations élevées de malonyl-CoA diminuent significativement l'oxydation lipidique en limitant l'entrée des lipides dans la mitochondrie par son effet inhibiteur sur la CPT-1 (Fig. 1.11). Par conséquent, en période de surconsommation ou de surplus énergétique, les taux élevés de malonyl-CoA favorisent la synthèse des lipides et suppriment l'oxydation lipidique. À l'inverse, en période de jeûne, les faibles taux de malonyl-CoA permettent l'entrée des lipides dans la mitochondrie pour l'oxydation [215].

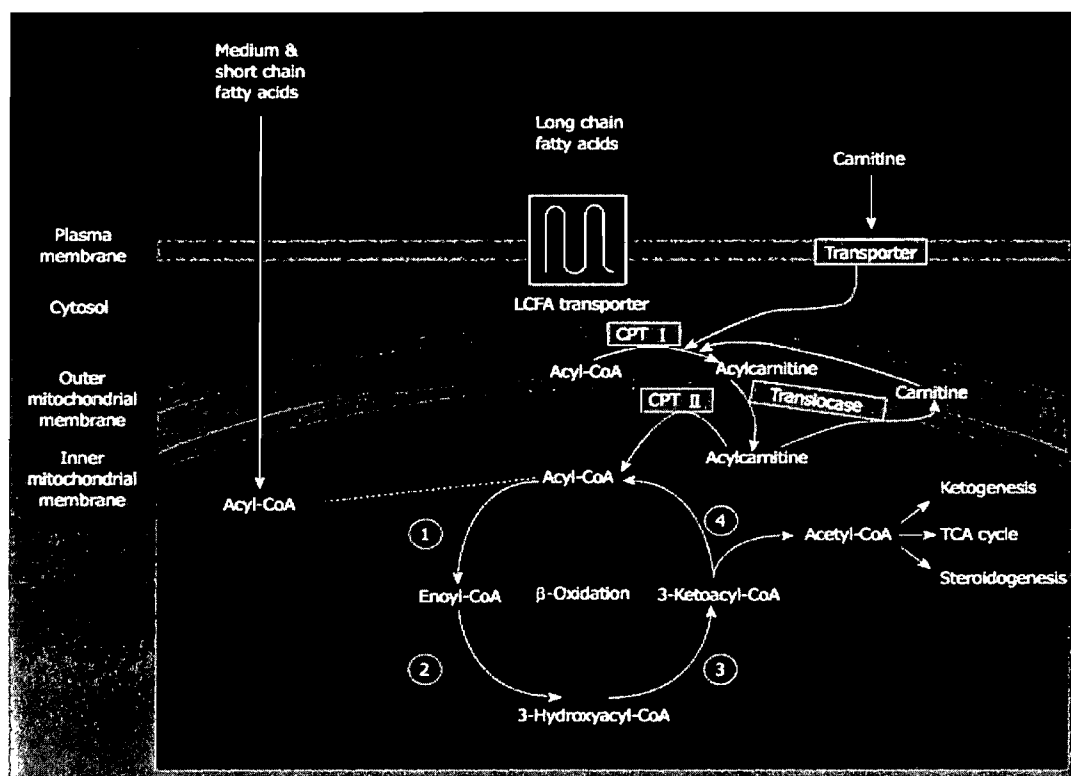


Figure 1.13 –  $\beta$ -oxydation mitochondriale. CPT-I, Carnitine Palmitoyl Transférase 1 ; CPT-II, Carnitine Palmitoyl Transférase 2 ; LCFA, *Long Chain Fatty Acid* ; TCA cycle, Cycle de Krebs. Tiré de Wei et al. [281].

D'autre part, il existe une relation au sein des voies oxydatives des lipides. La  $\omega$ -oxydation microsomale se spécialise surtout dans le catabolisme des AGNE saturés et insaturés, et produits des acides dicarboxyliques [189]. Ce type d'acides étant toxiques pour la mitochondrie par leur effet inhibiteur sur le système d'oxydation [174] et par leur implication dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène, ils sont métabolisés par la voie de la  $\beta$ -oxydation péroxisomale, qui se spécialise entre autres dans l'oxydation d'AGNE à très longues chaînes ( $>C20$ ) et des acides gras branchés [189]. Les acides dicarboxyliques à chaînes réduites issus du métabolisme de la  $\beta$ -oxydation péroxisomale sont finalement catabolisés par la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Fig. 1.14). Un système  $\beta$ -oxydatif péroxisomal joue ainsi un rôle crucial de détoxification au sein des hépatocytes [189]

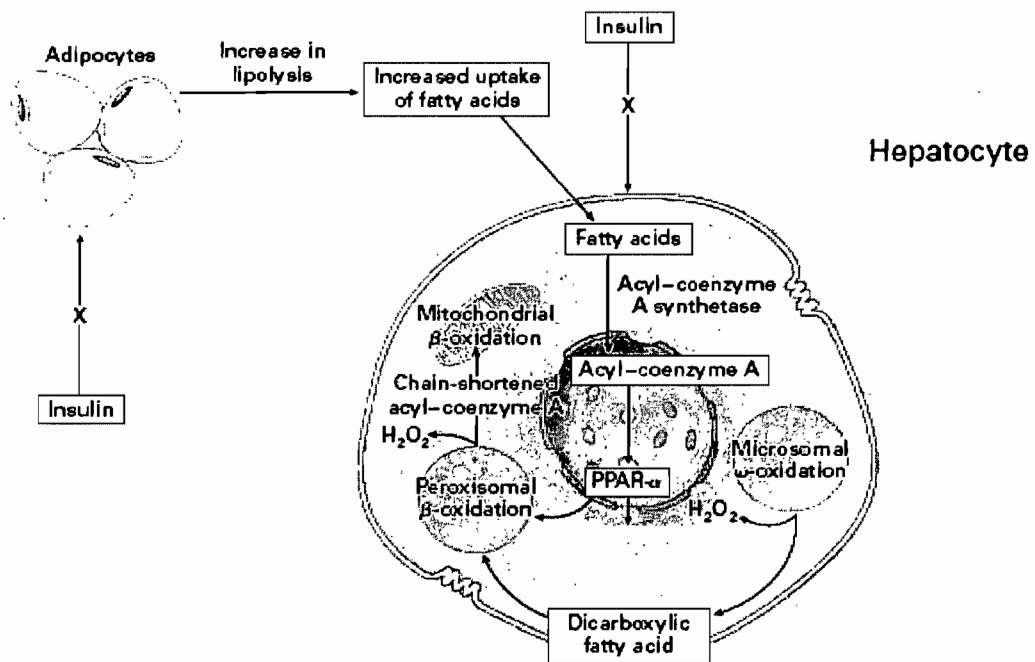


Figure 1.14 – Relation entre les voies d'oxydation lipidique au foie. La  $\omega$ -oxydation microsomale produit des acides dicarboxyliques, qui sont ensuite métabolisés par la voie de la  $\beta$ -oxydation péroxisomale. Les acides dicarboxyliques à chaînes réduites issus du métabolisme de la  $\beta$ -oxydation péroxisomale sont finalement catabolisés par la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Adapté de Angulo [7].

### 1.2.1.2 La SHNA et oxydation lipidique

Il est généralement admis que dans les conditions d'augmentation de l'arrivée d'AGNE au foie, telle la SHNA, les taux élevés d'oxydation mitochondriale sont inadéquats pour répondre à la surcharge lipidique engendrée par ces situations [7, 200], et par conséquent on note une activité des voies d'oxydation extra-mitochondriales (péroxisomale et microsomale) plus accrue [174, 214] (Fig. 1.15).

À l'appui de cette hypothèse, deux études ont montré une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et péroxisomale des lipides au foie chez des souris *ob/ob* [28] et C57BL-6 [163], accompagnée d'une activité enzymatique de la CPT plus élevée [28]. Similairement, des taux d'ARNm et de contenu protéique deux fois plus élevés des cytochromes P450 ont été mesurés chez des rats où la stéatose hépatique a été induite par une diète riche en lipides pendant trois semaines [166].

Ces résultats mesurés chez des animaux sont supportés par ceux d'études conduites chez des sujets SHNA. Dans leur étude, Kohjima et al. [148] ont rapporté une augmentation de l'expression génétique de deux enzymes composant la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, la *long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (LCDA) et la *long-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase  $\alpha$*  (HADH $\alpha$ ), accompagnée d'une augmentation significative d'enzymes composant la  $\beta$ -oxydation péroxisomale (BOX, branched-chain acyl-CoA oxidase) et la  $\omega$ -oxydation (CYP, cytochrome P450) en comparaison avec des sujets contrôles.

De plus chez les sujets présentant une stéatohépatite, Sanyal et al. [227] ont rapporté des concentrations élevées de  $\beta$ -OH butyrate circulants, reflétant indirectement l'oxydation hépatique plus accrue que leurs sujets contrôles. Similairement, Chalasani et al. [41] ont rapporté des taux d'oxydation des lipides au niveau systémique, mesurés par calorimétrie indirecte, plus élevés chez des sujets atteints de stéatohépatite en comparaison à des sujets contrôles. De plus, ces taux élevés étaient accompagnés d'une activité *in vivo* des cytochromes P450 deux fois plus accrue chez les sujets SHNA.

Diverses adaptations pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'oxydation lipidique au foie lors de la SHNA notamment par voie transcriptionnelle par le peroxisome

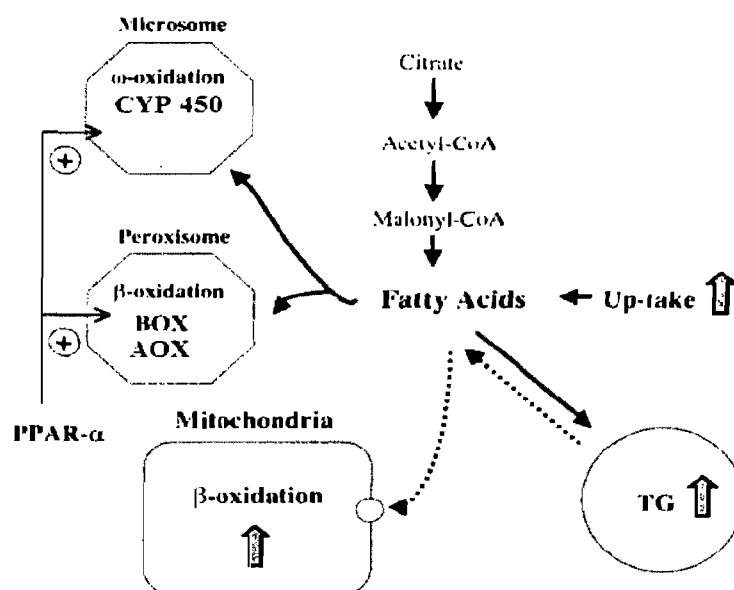


Figure 1.15 – Augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et la  $\beta$ -oxydation péroxisomale chez des sujets SHNA. Régulation de PPAR $\alpha$  sur la  $\omega$ -oxydation et la  $\beta$ -oxydation péroxisomale. BOX : *branched-chain acyl-CoA oxidase* ; CYP : cytochrome P450. Adapté de Kohjima et al. [148].

proliferator-activated factor alpha (PPAR $\alpha$ ) et par la régulation de l'insuline.

PPAR $\alpha$  appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires et son expression est prédominante dans les hépatocytes. Les AGNE intrahépatiques servent de ligands pour PPAR $\alpha$  [142], et l'activation de PPAR $\alpha$  induit l'expression de gènes responsables de l'oxydation mitochondriale et péroxisomale telles la CPT-1 et l'enzyme-clé de la  $\beta$ -oxydation péroxisomale, l'enzyme acyl-CoA oxydase (AOX) [8, 174] (Fig. 1.15).

Memon et al. [180] ont rapporté des taux d'ARNm de PPAR $\alpha$  au foie deux fois plus élevés chez des souris *ob/ob* et *db/db* ainsi que chez des rats nourris avec une diète riche en lipides [3, 216]. Ces niveaux plus élevés étaient accompagnés d'une augmentation de l'expression génétique de la CPT-1 [180] et de l'AOX [216]. Ces résultats suggèrent donc une régulation parallèle entre l'augmentation de la synthèse de PPAR et son activité transcriptionnelle. À l'inverse les souris invalidées sur gène PPAR $\alpha$  développent une SHNA [115].

D'autre part, l'insuline inhibe généralement l'oxydation des lipides hépatiques en favorisant la voie de synthèse *de novo* des lipides (Fig. 1.12). Toutefois, l'augmentation de la concentration des AGNE dans l'hépatocyte peut altérer la voie de signalisation de l'insuline et ainsi causer une résistance hépatique à l'insuline [37, 226]. La résistance hépatique à l'insuline pourrait alors contribuer à l'élévation des taux d'oxydation des lipides hépatiques lors de la SHNA.

Cependant, malgré l'augmentation de la capacité oxydative de l'hépatocyte face à la surcharge lipidique lors de la SHNA, il semble que d'autres facteurs peuvent contribuer au mauvais ajustement de l'oxydation des lipides hépatiques menant à l'accumulation de lipides au foie.

### 1.2.2 La production des VLDL hépatiques

Les mammifères ont recours à des lipoprotéines pour solubiliser les TAG et permettre leur transport dans la circulation plasmatique. Deux types de lipoprotéines assurent principalement le transport des TAG jusqu'aux tissus périphériques tels les muscles et les adipocytes : les chylomicrons et les VLDL hépatiques. Les chylomicrons produits par les entérocytes acheminent la majorité des TAG issus de la nutrition, tandis que les

VLDL synthétisés et sécrétés par les hépatocytes transportent les TAG issus du foie [95].

### 1.2.2.1 Le mécanisme de la production de VLDL-TAG hépatiques

La plupart des cellules eucaryotes contiennent des complexes membranaires internes nommés réticulum endoplasmique (RE). Cet ensemble de tubules et de feuillettes internes est le siège de nombreuses réactions chimiques spécifiques. Le RE est le principal site de réserve de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et de la synthèse de protéines de la cellule [80]. Également, le RE joue un rôle déterminant dans la production de VLDL hépatiques.

La production des VLDL hépatiques est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs enzymes. Les AGNE extracellulaires pénètrent dans l'hépatocyte où ils sont estérifiés en TAG par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase-1 (DGAT-1), appelé aussi *overt* DGAT, situé sur la face cytosolique du RE [95]. Ensuite, les TAG sont mis en réserve dans une gouttelette lipidique au sein du cytosol des hépatocytes juste avant leur sécrétion sous forme de VLDL [94] (Fig. 1.16).

Lors de la mobilisation des TAG hépatiques, la lipolyse hépatique est orchestrée par l'action des lipases hépatiques : l'arylacétamide déacétylase (AADA) et triacylglycérol hydrolase (TGH). Les AGNE et les DAG résultant de cette lipolyse intrahépatique sont par la suite réestérifiés en TAG par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase-2 (DGAT-2), appelé aussi *latent* DGAT ; cet isoenzyme provient d'un gène distinct de celui de la DGAT-1 [40] et son expression est régulée différemment de celle de la DGAT-1 [280]. Les TAG microsomaux formés par l'action de la DGAT-2 peuvent être soit recyclés et retournés à la gouttelette lipidique dans le cytosol, soit voués à la sécrétion au sein des VLDL du côté luminal du RE [95] (Fig. 1.17).

Un modèle du mécanisme d'incorporation des TAG dans les VLDL a été proposé par Havel et al. il y a plus de 30 ans [5]. Ce modèle est encore aujourd'hui généralement accepté pour expliquer la production de VLDL et suggère que les VLDL vouées à la sécrétion sont formées en deux stades distincts [5, 235]. Le premier stade du processus de production des VLDL hépatiques est orchestré par la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) qui produit une petite particule dense contenant une apoprotéine B (apoB) nommée précurseur des VLDL [102, 223, 235] (Fig. 1.17). L'apoB est



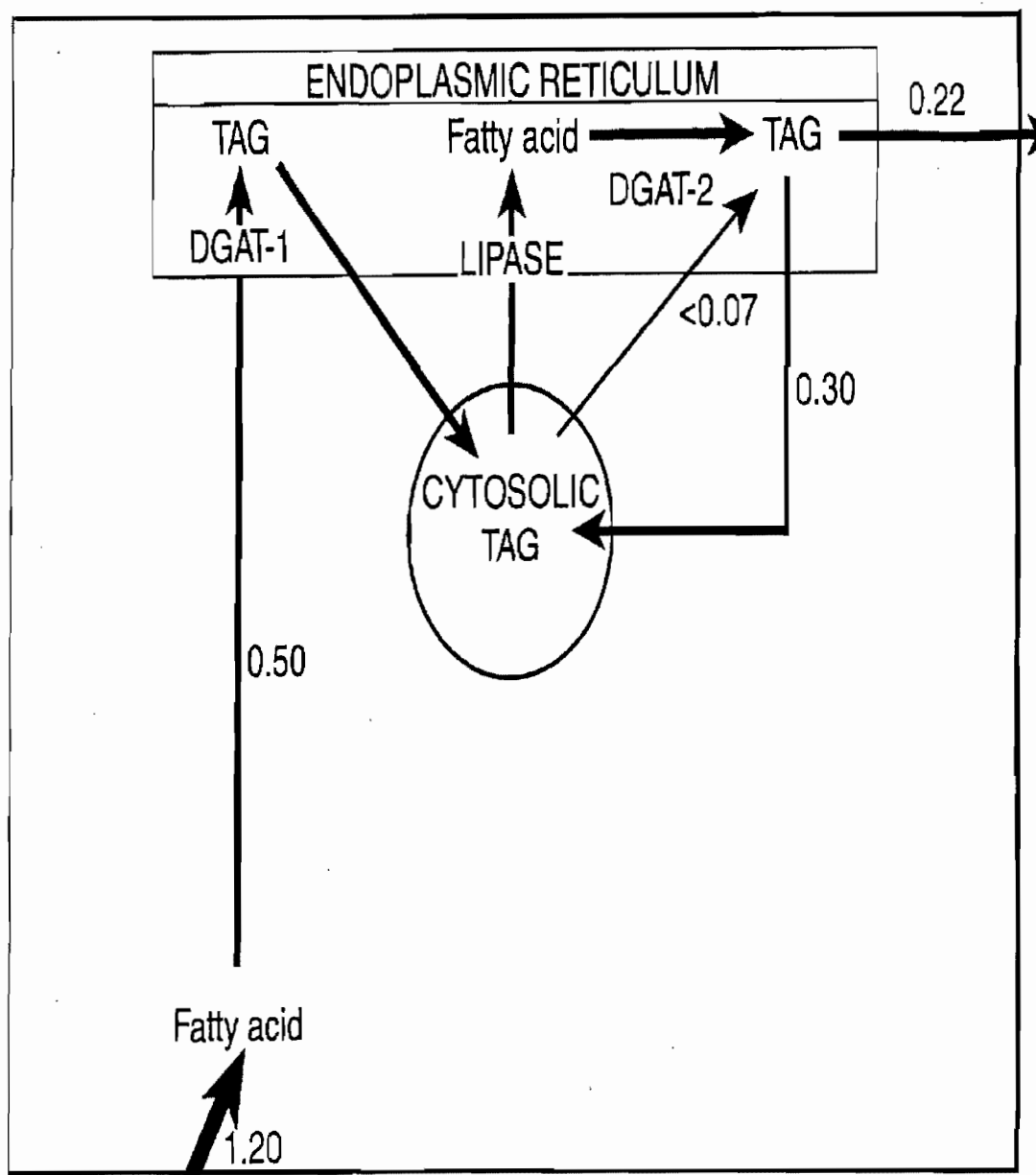


Figure 1.16 – Suite à la réestérification des AGNE extracellulaires par l'action de la DGAT-1, les TAG formés sont emmagasinés dans les gouttelettes lipidiques du cytosol. Lors de la mobilisation des TAG cytosoliques par l'action de lipases et de la réestérification subséquente des AGNE dans le micrososome par la DGAT-2, une partie des TAG microsomaux sont sécrétés sous forme de VLDL, et une autre partie est retournée au sein de la gouttelette lipidique du cytosol. Fatty acid, acides gras ; DGAT-1,2, Diacylglycérol Acyl Transférase -1,2. Adapté de Gibbons 2000 [94].

une protéine constitutive des lipoprotéines nécessaire à la synthèse et au transport des lipoprotéines en milieu aqueux [131]. L'apoB existe sous deux isoformes dans le plasma, l'apoB48 et l'apoB100. Chez l'humain, les particules de VLDL produites par les hépatocytes et les chylomicrons produits par les entérocytes contiennent une seule molécule d'apoB100 et d'apoB48, respectivement. Toutefois, chez le rat et chez la souris, les hépatocytes ont aussi la capacité de produire l'apoB48 [101].

Le deuxième stade du processus de la formation des VLDL, la phase de maturation, est caractérisée par la fusion du précurseur des VLDL contenant l'apoB avec une particule plus volumineuse riche en TAG, et donne lieu à un VLDL mature ayant une densité de 1.1-1.2 g/ml [210] prédisposé à la sécrétion. Les détails de ce processus demeurent obscurs, mais il semble que la formation de la particule riche en TAG et la fusion de cette molécule avec le précurseur des VLDL sont dépendantes de l'activité de l'ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1), une protéine couplée à la GTP (GTP-binding protein) qui active la phospholipase D (PLD) [17, 100] (Fig. 1.17). Ainsi, on remarque que l'inhibition de l'hydrolyse de la GTP en GDP sur l'ARF-1 entrave la phase de maturation du VLDL sans affecter la formation du précurseur des VLDL contenant l'apoB ([222].

Les particules de VLDL sont majoritairement composées de TAG (60%), mais aussi de phospholipides (15%), de cholestérol (15%) et de protéines (10%) [102]. Chez les sujets sains, la sécrétion des VLDL hépatiques est un moyen efficace pour éliminer les TAG hépatiques et prévenir leur accumulation potentielle au foie. Ainsi, une altération dans la régulation de ce mécanisme pourrait contribuer au développement de la SHNA.

### **1.2.2.2 La régulation de la production de VLDL hépatiques**

Le cycle futile réestérification/sécrétion existant au sein des hépatocytes (Fig. 1.16) est principalement régulé par l'activité de l'enzyme-clé du processus de la production des VLDL hépatiques, la MTP, de même que par l'insuline. De plus, la production des VLDL hépatiques peut être affectée par certaines situations pathophysiologiques telles la SHNA et l'IR, de même que par certaines situations physiologiques comme l'entraînement physique.

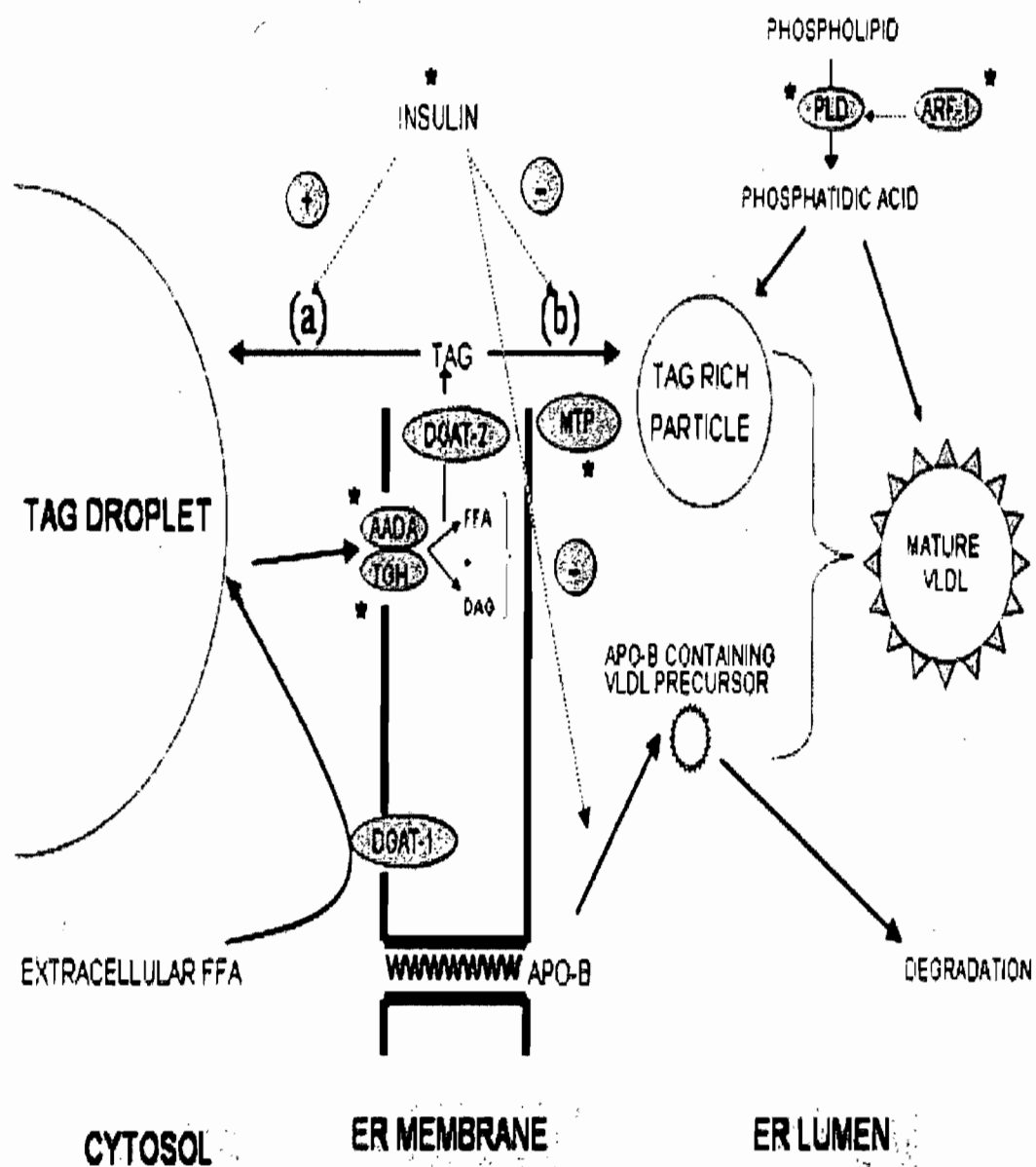


Figure 1.17 – Mécanisme de la synthèse et de la sécrétion des VLDL hépatiques et cibles de régulation de cette voie. Voir le texte pour plus d'informations. FFA, *Free Fatty Acids*; ER, *endoplasmic reticulum*; AADA, *Arylacétamide Déacétylase* (AADA); TGH, *Triacylglycérol Hydrolase*; ApoB, *Apolipoprotéine B*; DGAT-1, *Diacylglycérol Acyl Transférase -1*; DGAT-2, *Diacylglycérol Acyl Transférase -2*; MTP, *Microsomal Triglyceride transfer protein*. Adapté de Gibbons 2004 [95].

### *La MTP et production de VLDL hépatiques*

La MTP est une protéine hétérodimérique exprimée du côté luminal du RE des hépatocytes [283, 284] ; elle est constituée d'une sous-unité catalytique de 97kDa et d'une protéine multifonctionnelle de 55kDa, la disulfide isomérase [283].

L'absence, l'inhibition de l'activité et la surexpression de la MTP sont des moyens utilisés pour étudier plus spécifiquement le rôle de la MTP dans la production des VLDL hépatiques. L'absence de la MTP chez les sujets abétalipoprotéïnémiques, un désordre récessif autosomal caractérisé par une mutation du gène de la MTP, se traduit par des concentrations d'apoB plasmatiques indétectables chez ces patients [243, 282]. Similairement, la délétion du gène de la MTP hépatique chez des souris entraîne une altération de la sécrétion de VLDL, reflétée par des concentrations d'apoB plasmatiques significativement plus faibles chez ces souris par rapport aux souris contrôles [206, 207]. De plus, la déficience du gène de la MTP [206, 207] chez les souris et un polymorphisme de ce gène chez l'humain [86] ont été associés au développement de la SHNA.

L'inhibition pharmacologique de la MTP est un moyen simple, en comparaison à la délétion génétique, d'étudier le rôle de la MTP dans la production hépatique de VLDL. Les inhibiteurs de la MTP sont une famille de composés pharmacologiques qui bloquent l'action de la MTP hépatique pour l'assemblage et la production des VLDL. Deux groupes de chercheurs se sont penchés sur l'étude de la cinétique d'infiltration de lipides au foie chez la rate en réponse à différentes concentrations d'un inhibiteur de la MTP. Dans leur étude, Zhang et al. [294] ont montré que l'administration d'un inhibiteur de la MTP (1 mg/kg) pendant quatre jours consécutifs à des rats augmentait le contenu en TAG hépatiques de ~50% en comparaison à des rats contrôles. Similairement, Miyazaki et al. [181] ont rapporté une augmentation de la concentration des TAG hépatiques de 8 fois, accompagnée d'une diminution de ~46% des TAG plasmatiques suite à un traitement de deux semaines avec un inhibiteur de la MTP d'une concentration de 3mg/kg/jour chez des rats en comparaison à des rats contrôles.

Ces résultats sont confirmés par des observations faites chez l'humain. Cuchel et al. [53] ont noté une diminution de 35% des TAG plasmatiques accompagnée d'une accumulation du contenu en TAG hépatiques de 10 à 40% suite à l'administration d'un

inhibiteur de la MTP pendant quatre semaines.

À l'inverse, Tietge et al. [267] ont surexprimé la MTP par transfection adénovirale chez des souris. Ces auteurs ont montré qu'une augmentation de l'activité de la MTP de  $\sim 3$  fois entraînait une élévation de  $\sim 2$  fois des taux de sécrétion *in vivo* des VLDL en comparaison à des souris contrôles ( $184 \pm 12$  vs  $96 \pm 8$  mg/kg/h).

En somme, ces résultats suggèrent que la MTP joue un rôle crucial dans la synthèse et la sécrétion des VLDL hépatiques, et que des variations de l'expression et de l'activité de la MTP affectent aussi la production de VLDL. Ainsi, un défaut ou un dérèglement de l'expression ou de l'activité de cet enzyme pourrait donc potentiellement être à l'origine du développement de la SHNA.

#### *L'insuline et la production de VLDL hépatiques*

L'augmentation de la concentration d'insuline semble stimuler le recyclage des TAG au sein des gouttelettes lipidiques dans le cytosol des hépatocytes, ce qui constituerait un des mécanismes par lesquels l'insuline inhibe la sécrétion des VLDL [95].

L'insuline semble avoir des effets directs et indirects sur la production de VLDL hépatiques chez les rats et chez les humains. La région promotrice de la MTP est négativement régulée par l'insuline, faisant en sorte que l'insuline peut directement atténuer l'expression génétique de la MTP [168] et ainsi, diminuer le taux de synthèse et de sécrétion des VLDL hépatiques. De même, l'insuline peut interférer directement avec la production des VLDL hépatiques au niveau de la phase de maturation des VLDL-TAG [33] via la régulation qu'elle exerce sur l'apoB (Fig. 1.17). Lin et al. [168] ont montré que les concentrations d'ARNm et le taux de sécrétion d'apoB étaient diminués de 31% et 43% respectivement, lorsque des hépatocytes (HepG2) en culture étaient incubés avec de l'insuline ( $10^{-7}$  M). Similairement, Salhanick et al. [224] ont rapporté une atténuation de  $\sim 34\%$  de la sécrétion de l'apoB lorsque des hépatocytes isolés étaient incubés avec de l'insuline (100 nM/L) pendant deux heures en comparaison à des valeurs contrôles. Ces résultats sont supportés par des recherches conduites sur des hépatocytes primaires en culture issus de rats. Sparks et al. [250] ont noté une diminution de  $\sim 37\%$  de la sécrétion d'apoB en présence d'insuline (10 nM) en comparaison à des valeurs contrôles. Ces auteurs suggèrent que la diminution de la sécrétion de l'apoB par l'insuline pourrait

être due à l'augmentation de la dégradation de la molécule d'apoB avant qu'elle ne soit sécrétée [248] et/ou à la diminution de sa synthèse [42].

D'autre part, puisque la production de VLDL est aussi régulée par la disponibilité des substrats intrahépatiques, l'insuline peut indirectement interférer sur la production de VLDL hépatiques par son effet antilipolytique sur le tissu adipeux [48] (voir section lipolyse adipocytaire). Parmi les sources potentielles de TAG intrahépatiques, il semble que dans des conditions normales, les AGNE circulants issus de la lipolyse adipocytaire contribuent principalement à la réserve de TAG hépatiques [1, 49, 64, 93] et ainsi, à la voie de sécrétion des VLDL-TAG hépatiques [229]. Des résultats issus de technique de perfusions hépatiques *in vitro* chez le rat indiquent que le foie a une capacité élevée de synthèse de TAG hépatiques à partir de concentrations extrêmement élevées d'AGNE [229, 276]. Dans certaines conditions, on peut noter une augmentation de ~6 fois du contenu de TAG hépatiques dans un délai de deux heures lors de perfusion hépatique *in vitro* chez les rats [276]. D'ailleurs, il a été suggéré que le contenu en TAG hépatiques régule l'activité de la MTP par voie de transcription génétique. Taguchi et al. [262] ont montré une corrélation de  $r = 0,672$  entre le contenu hépatique en TAG et l'activité de la MTP. De plus, Hagan et al. [108] ont identifié une région encodant le facteur de transcription *hepatocyte nuclear factor* (HNF-4) dans la région promotrice du gène de la MTP. Le HNF-4 encode des gènes des apoprotéines et récemment, il a été montré que les acyl-CoA sont des ligands directs pour HNF-4 [119]. Ainsi, les acides gras présents dans les hépatocytes peuvent possiblement directement réguler l'activité du facteur de transcription HNF-4 et l'expression de gènes reliés au métabolisme des lipoprotéines.

### **Pathophysiologies et production des VLDL hépatiques**

#### *La SHNA et la production des VLDL hépatiques*

Il a été suggéré qu'une fonction importante de la sécrétion de VLDL serait d'atténuer ou de prévenir le développement de la SHNA. Dans leur étude, Bartels et al. [19] ont noté une augmentation du taux de sécrétion des VLDL chez des souris génétiquement obèses *ob/ob* associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la MTP. De même, l'étude de Lin et al. [169] visait à établir une relation entre les concentrations de TAG hépatiques et les taux de sécrétion de VLDL *in vivo* chez différents modèles génétiques

dé SHNA. Ces auteurs ont trouvé que les souris présentant les degrés de stéatose les plus sévères (jusqu'à ~316 mg TAG /g protéines) avaient aussi des taux de sécrétion de VLDL *in vivo* plus importants (jusqu'à 800 mg/dL après 120 minutes). Ainsi, ces résultats suggèrent que les modèles d'animaux qui présentent de façon spontanée une SHNA ont une sécrétion de VLDL accrue.

D'autre part, une diète riche en lipides est fréquemment utilisée comme un modèle d'induction de SHNA chez les animaux. Ce modèle d'induction de la SHNA est probablement le plus représentatif de ce qui est observé chez l'humain lors de la SHNA dans un contexte d'obésité et d'insulino-résistance.

La plupart des études sur la production de VLDL dans un contexte de SHNA induite une la diète riche en lipides chez les animaux, mais pas toutes [81], ont rapporté une augmentation de la sécrétion de VLDL. Dans leur étude, Bennett et al. [22] ont rapporté qu'une augmentation de la concentration des lipides de 11,7 à 46,8% (% énergie) dans la diète causait une augmentation de 60% de l'expression génétique de la MTP chez le hamster. Similairement chez le rat, Taguchi et al. [262] ont noté une augmentation de 78% et 46% de l'activité de la MTP et de l'expression génétique respectivement, lorsque la concentration en lipides dans la diète était augmentée de 10 à 30% (% énergie). L'interprétation de ces résultats obtenus chez les modèles génétiques et les modèles nutritionnels est difficilement applicable directement chez l'humain. Néanmoins, il reste que le modèle d'induction de la SHNA par une diète est le plus près de ce qui est observé chez l'humain lors de la SHNA.

Très peu d'études ont été conduites chez l'humain afin d'évaluer les effets de la SHNA sur la production de VLDL. De plus, les résultats indiquant des taux de sécrétion des VLDL dans un contexte d'induction de la SHNA par une diète riche en lipides chez les humains présentent certaines discordances.

Fabbrini et al. [75] rapportent un taux de sécrétion *in vivo* de VLDL hépatiques deux fois plus élevé chez des sujets obèses ayant une SHNA en comparaison à des sujets obèses sans SHNA. Ces résultats suggèrent que malgré l'augmentation des taux de synthèse et de sécrétion des VLDL-TAG, la capacité d'éliminer les lipides hépatiques par la voie des lipoprotéines est toutefois insuffisante pour compenser l'accumulation des

lipides. Par contre, Diraison et al. [65] n'ont observé aucune différence dans le taux de sécrétion *in vivo* de VLDL entre des sujets atteints de SHNA et des sujets sains suite à une infusion de lipides marqués. Ces auteurs suggèrent que le métabolisme hépatique des lipides chez les sujets SHNA serait davantage orienté vers l'accumulation hépatique des lipides plutôt que vers leur sécrétion et de plus, que les concentrations plasmatiques élevées d'insuline présentes chez ces patients pourraient jouer un rôle déterminant dans le développement de la SHNA en favorisant le recyclage et l'emmagasinement des TAG au foie.

#### *L'insulino-résistance et la production de VLDL hépatique*

Les effets de l'insuline sur le métabolisme des VLDL hépatiques ont des répercussions globales dans l'organisme, en particulier sur la régulation des concentrations de TAG plasmatiques [249, 275]. L'hypertriglycéridémie est l'anormalité lipidique la plus commune retrouvée chez des sujets IR, et il a été suggéré que l'hypertriglycéridémie associée à l'IR résultait d'une augmentation de la production de VLDL hépatiques [129, 211]. En effet, l'inefficacité de l'inhibition de l'insuline sur la sécrétion des VLDL-TAG hépatiques est constatée lors de clamps hyperinsulinémiques/euglycémiques chez les individus obèses [161] ainsi que chez des sujets atteints de diabète de type 2 [233].

Des modèles animaux génétiquement insulino-résistants de même que des modèles d'induction d'IR par une diète ont été examinés afin d'élucider le lien entre l'insuline et la production de VLDL-TAG hépatique. On dénote une résistance à l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de VLDL chez des hépatocytes issus de rats génétiquement obèses [249]. Similairement, l'insuline n'a atténué les taux de production *in vivo* de VLDL seulement que de 20% chez les souris génétiquement obèses comparée à environ 60% chez des souris maigres [285]. D'autre part, le développement de l'IR chez les hamsters où la SHNA est induite par l'administration d'une diète riche en fructose résulte en une augmentation de la production de VLDL de même qu'une augmentation de l'expression génétique, de la quantité protéique et de l'activité de la MTP hépatique [260, 261]. À l'inverse, l'administration d'un traitement de rosiglitazone, un médicament hypoglycémiant appartenant à la famille des thiazolidinédiones utilisé chez les patients atteints de diabète de type 2, améliore la résistance à l'insuline, rétablit l'expression gé-



nétique de la MTP et réduit la synthèse de VLDL hépatiques chez des hamsters nourris à une diète riche en fructose [39].

D'après les résultats obtenus sur les modèles de SHNA chez les animaux de même que ceux obtenus chez les humains, il semble que la diminution des VLDL hépatiques pourrait contribuer au déclenchement du développement de la SHNA. Toutefois, lorsque la SHNA se développe et s'amplifie, la production des VLDL hépatiques se voit augmentée pour ainsi compenser l'augmentation de l'accumulation des lipides au foie. De futures études seront nécessaires afin d'éclaircir cette ambiguïté. D'autre part, des évidences suggèrent un rôle pour la glycémie dans la régulation de la production des VLDL-TAG hépatiques. La conversion de l'excès de glucides en acides gras hépatiques (Fig. 1.11) suivie de la sécrétion de VLDL-TAG semble partiellement réguler le taux de glycémie [233]. De ce point de vue, l'hypertriglycéridémie est parfois la conséquence d'un contrôle adéquat de la concentration de glucose plasmatique.

### 1.2.3 Entraînement et production de VLDL-TAG hépatiques

Il est bien connu que l'entraînement améliore le profil lipidique de sujets hypertriglycéridémiques et de sujets sains sédentaires [97, 116, 150], et à l'inverse, une augmentation de la concentration des TAG plasmatiques est notée lors d'un désentraînement à court terme [114].

Puisque les VLDL hépatiques contribuent fortement à l'augmentation des taux de TAG en circulation, et que l'entraînement physique améliore les taux de TAG plasmatiques, il ne serait donc pas surprenant que la production de VLDL hépatiques soit diminuée suite à un programme d'entraînement.

Chez le rat, une diminution de la production *in vivo* des VLDL suite à un entraînement physique volontaire a été rapportée en comparaison à des rats sédentaires [183]. À l'appui de ces résultats, une étude récente a rapporté les effets d'un entraînement physique par intervalle sur la production *in vivo* des VLDL hépatiques chez l'humain. Tsekouras et al [272] ont noté une diminution de 35% des taux de sécrétion *in vivo* des VLDL chez des sujets suite à un entraînement physique de deux mois, en comparaison à des sujets sédentaires.

De plus, quelques auteurs ont évalué les effets d'un entraînement physique sur la production de VLDL hépatiques dans des contextes pathophysiologiques. Simonelli et al. [245] ont noté une diminution de la production *in vivo* de VLDL chez des rats génétiquement obèses suite à un entraînement volontaire. Similairement chez des diabétiques de type 2, Alam et al. [4] ont noté une diminution des taux de sécrétion *in vivo* de VLDL, mesurés par traçage isotopique, suite à un entraînement en endurance de six mois.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a évalué les effets d'un entraînement physique en endurance sur la production *in vivo* de VLDL hépatiques chez des sujets SHNA, et ce en relation avec le contenu de l'enzyme-clé de la production de VLDL hépatiques, la MTP. Toutefois, la plupart des études rapportent des effets bénéfiques de l'entraînement physique sur les facteurs pouvant contribuer à la diminution de la production de VLDL hépatiques. Notamment, la diminution du contenu de TAG intra-hépatiques [89, 90] et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline sont notées suite à un programme d'entraînement [187]. De ce fait, des répercussions au niveau intra-hépatique, i.e. régulation de la MTP par les lipides et l'insuline (voir section 1.2.2.2), de même qu'au niveau extra-hépatique, i.e. diminution des concentrations d'AGNE possiblement par l'effet inhibiteur de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire [183], devraient être observés.

### 1.3 Conséquences associées à la SHNA : le stress du RE hépatique

Bien que la SHNA soit principalement associée à l'obésité [70], à l'insulino-résistance [106] et au diabète de type 2 [45, 193], de récentes évidences suggèrent que la SHNA est également liée à des perturbations cellulaires tel le stress du RE hépatique.

#### 1.3.1 Généralités sur le métabolisme du RE

Outre les fonctions du RE dans la réserve intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  et le métabolisme des VLDL hépatiques (voir section 1.2.2), le RE joue également un rôle crucial dans le métabolisme des protéines. Les ribosomes juxtaposés à la surface du RE constituent un compartiment où la synthèse des protéines débute, ces protéines étant ensuite repliées

dans leur conformation appropriée par des protéines chaperons. Certaines d'entre elles subiront certaines modifications additionnelles dans la lumière du RE [80]. Le RE est le compartiment où transitent obligatoirement les protéines synthétisées, et qui par les processus de modifications et de repliement protéiques assure un contrôle de la qualité dans la synthèse des protéines de l'organisme. De ce fait, les protéines repliées adéquatement sont conduites à la voie de sécrétion, par contre en situation inverse, les protéines seront dégradées par des protéasomes via un processus appelé *ER-associated-degradation* (ERAD) [71, 246]. En général, il a été estimé que 30% de la synthèse totale de protéines étaient vouées à la dégradation immédiate [231].

### 1.3.2 La *unfolded protein response* (UPR)

Des concentrations élevées de protéines chaperons sont généralement présentes dans la lumière du RE [160, 188] servant à maintenir un équilibre entre l'afflux des protéines et la capacité de repliement de ces dernières. Ce processus est défini comme la réponse UPR basale [110, 139, 185, 199, 290, 293]. La réponse UPR basale est un processus physiologique normal contribuant au maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment par la contribution du RE dans la prise en charge d'une synthèse accrue de protéines au sein de cellules possédant une forte capacité sécrétrice telles les cellules  $\beta$  du pancréas et les hépatocytes. Par ailleurs, l'implication de la voie UPR est indispensable à la différenciation et à la maturation de certaines cellules spécialisées du système immunitaire, tels les lymphocytes B [217].

Puisque l'afflux de protéines au RE est variable et est assujéti aux changements des conditions environnementales de la cellule, une adaptation rapide et efficace du processus de repliement du RE est requise afin de répondre adéquatement aux situations dynamiques de la cellule et préserver la survie cellulaire. Cependant, une altération dans la capacité de repliement des protéines entraîne une surcharge protéique qui résulte en une augmentation de l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Cette accumulation de protéines inadéquatement repliées semble engendrer le développement d'un stress du RE qui se traduit par une exacerbation de la réponse UPR afin de rétablir l'homéostasie du RE [136, 140, 173, 230].

### 1.3.2.1 Le mécanisme de la réponse UPR

L'activation de la réponse UPR implique l'activation de trois récepteurs transmembranaires du RE : la *PKR-like kinase* (PERK) [237], le *activating transcription factor 6* (ATF6) [117] et le *inositol requiring enzyme 1* (IRE1) [186]. Généralement, ces récepteurs transmembranaires sont maintenus dans un état inactif par leur association à une protéine chaperon de la famille des *glucose-related proteins* (GRP) (Fig. 1.18) qui incluent entre autres, la GRP78 (appelé aussi *immunoglobulin heavy-chain-binding protein*, BiP). La GRP78 a été découverte à l'issue de l'observation d'une augmentation de l'induction de l'expression de cette protéine lors de carences en glucose chez des cellules embryonnaires en culture [242]. Par ailleurs, il a été rapporté que d'autres facteurs tels l'ischémie [170] et des agents qui affectent les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE [162] peuvent aussi contribuer à l'activation de l'expression des gènes des GRP.

Lors de l'activation des trois protéines transmembranaires par la dissociation de la GRP78, la réponse UPR engendre l'activation des voies traductionnelle et transcriptionnelle. La voie traductionnelle est la première qui se met en place et s'effectue par l'activation de PERK et la phosphorylation immédiate du *translation initiation factor 2 $\alpha$*  (eIF2 $\alpha$ ) [237]. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  permet d'atténuer la traduction protéique et ainsi d'éviter une surcharge supplémentaire de protéines dans la lumière du RE [113]. L'absence de phosphorylation d'eIF2 par PERK ainsi qu'une absence d'atténuation de la traduction protéique sont notées chez des cellules pancréatiques issues de souris invalidées du gène *perk* [111]. De plus, l'absence de PERK entraîne une hypersensibilité aux toxines et conséquemment une altération du processus de repliement du RE chez des cellules embryonnaires de souris [112]. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle crucial de PERK dans l'adaptation cellulaire en réponse au développement du stress du RE.

D'autre part, l'activation de la voie transcriptionnelle via l'ATF6 et l'IRE1 en réponse au stress du RE permet d'augmenter l'expression génétique codant pour des protéines chaperons et des protéines de dégradation. La libération d'ATF6 par GRP78 entraîne sa migration vers le noyau et sa fixation subséquente sur des séquences de *ER stress response element* (ERSE). Ensuite, la stimulation de la transcription de gènes impliqués

dans la synthèse de protéines chaperons (ex. : GRP78) ou des enzymes *foldases* (ex. : protéine disulfide isomérase, PDI) est enclenchée, résultant en une augmentation de la capacité de repliement des protéines [80]. Finalement, l'induction de l'activité d'IRE1 provoque l'épissage du facteur de transcription *X-box DNA-binding protein* (XBP1) impliqué dans la transcription de gènes codant des enzymes impliquées dans la voie de dégradation des protéines *ER-associated degradation* (ERAD) [71, 246]. La surexpression de XBP1 au sein de cellules amène une résistance au stress du RE et à l'inverse, on retrouve une exacerbation de la réponse UPR chez les modèles de perte de fonction de XBP1 [197].

Lorsque ces voies traductionnelle et transcriptionnelle sont insuffisantes afin de rétablir l'homéostasie, trois mécanismes du processus apoptotique sont alors enclenchés. Le premier mécanisme implique les protéines apoptotiques (Bak, Bax) qui activent la voie de la caspase 12 [80]. En second lieu, l'inhibition de l'expression de la protéine Bcl2 par la protéine CHOP. Finalement, IRE-1 forme un complexe avec le *tumor necrosis factor receptor associated factor 2* (TRAF-2) et l'*apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK-1), menant à l'activation de la *c-Jun kinase* (JNK).

### 1.3.2.2 Perturbations et mécanismes associés au développement de la réponse UPR

La réponse UPR joue un rôle important au sein de plusieurs tissus de l'organisme. Dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, des études ont rapporté une diminution de la voie UPR, rendant les cellules vulnérables aux agressions et pouvant entraîner la mort cellulaire [138]. Au pancréas, la perte de fonction de la kinase PERK conduit au syndrome de Wolcott-Rallison caractérisé par un diabète juvénile chez l'homme, [56]. Similairement l'invalidation du gène PERK chez la souris (PERK<sup>-/-</sup>) mène au développement d'un diabète sévère et à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas [111].

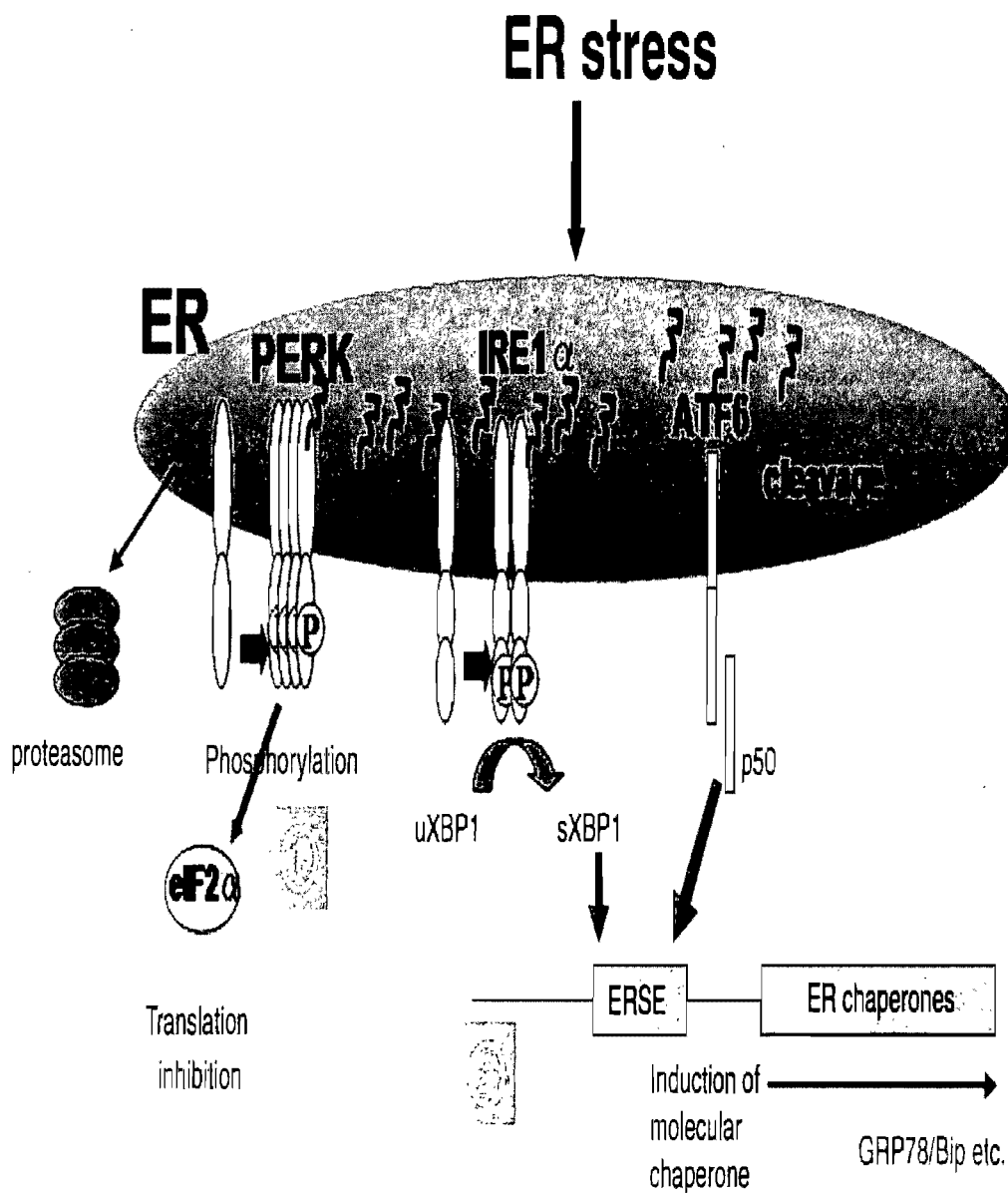


Figure 1.18 – Les récepteurs transmembranaires, les molécules cibles et les effets. 1- voie de PERK résultant en une atténuation de la transcription. 2- Voies d'IRE-1 et d'ATF6 résultant en une augmentation de la transcription de protéines chaperons et des enzymes impliqués dans la voie de dégradation. Voir texte pour plus d'informations. PERK, *PKR-like kinase*; ATF6, *activating transcription factor 6*; IRE1, *inositol requiring enzyme 1*; XBP1, *X-box DNA-binding protein*; eIF2 $\alpha$  *translation initiation factor*; ERSE, *ER stress response element*. Adapté de Katayama et al. [138].

Des évidences récentes suggèrent que la réponse UPR pourrait jouer un rôle important non seulement dans les neurones et les cellules  $\beta$  du pancréas, mais aussi dans des tissus périphériques sensibles à l'insuline, tel le foie. En effet, des dysfonctionnements de la voie UPR ont été associés à certaines conditions physiopathologiques telles l'obésité, l'IR et la SHNA.

### **Situations physiopathologies : l'obésité, l'IR et la SHNA**

#### *L'obésité et le stress du RE hépatique*

Il a été postulé que l'obésité est un stimulus chronique lié au développement du stress du RE au foie [197]. Ainsi, un modèle de souris génétiquement obèse et insulino-résistante (*ob/ob*), ainsi qu'un modèle d'induction d'obésité par diète riche en lipides chez des souris C57BL/6, ont été utilisés afin d'étudier le lien entre le stress du RE au foie et l'obésité. L'activation de la voie UPR hépatique décelée par une augmentation de l'ARNm de la protéine chaperon GRP78 dans le foie, de même qu'une augmentation des taux de phosphorylation de PERK et d'eIF2 $\alpha$ , ont été observées chez des extraits de foie de souris *ob/ob* et des souris C57BL/6 soumises à une diète riche en lipides en comparaison à leurs groupes contrôles [197] (Fig. 1.19). Cependant, le mécanisme exact expliquant le lien entre l'obésité et l'augmentation du niveau de stress du RE hépatique n'est pas encore élucidé.

#### *L'IR et le stress du RE hépatique*

La première étape menant à l'activation de la cascade de signalisation de l'insuline implique la phosphorylation de substrats appelés *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) sur leurs résidus tyrosine. Toutefois, une réduction de la signalisation de l'insuline est observée via la phosphorylation des résidus sérine de l'IRS-1 médiée par l'action de JNK, qui à son tour peut être activée par l'augmentation de l'activité d'IRE1, un marqueur moléculaire du stress du RE [122, 258, 274] (Fig. 1.20).

Afin d'élucider le rôle du stress du RE hépatique dans le mécanisme d'action de l'insuline au foie, des études chez des modèles expérimentaux d'induction du stress du RE par deux agents communément utilisés, la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique, et la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe à calcium du réticulum endoplasmique [87],

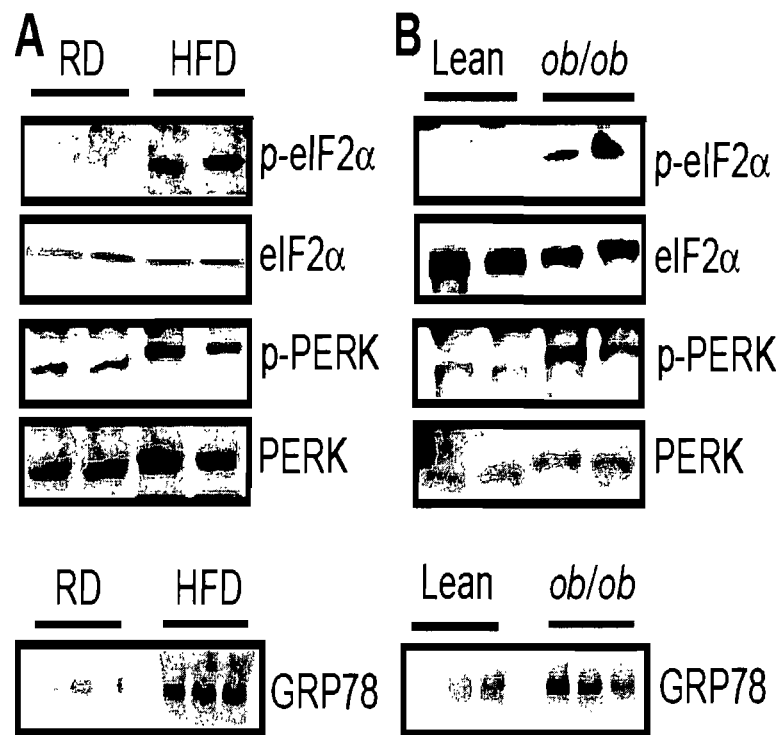


Figure 1.19 – Augmentation du stress du RE hépatique mesurée par les taux de phosphorylation des marqueurs moléculaires du stress du RE (PERK et eIF2) et par l'augmentation des taux d'ARNm de la protéine chaperon GRP78 (A) chez des souris C57BL/6 soumis à une diète riche en lipides ainsi que (B) chez des souris génétiquement obèses (*ob/ob*). RD, diète standard ; HF, diète riche en lipides ; GRP78, *glucose-related protein 78* ; eIF2, *translation initiation factor*, p-eIF2 ; phosphorylation de la *translation initiation factor* ; PERK, *PKR-like kinase* ; p-PERK, phosphorylation de *PKR-like kinase*. Adapté de Ozcan et al.[197].



ont été conduites sur des hépatocytes isolées (cellules *Fao*) [191].

Ozcan et al. [197] ont rapporté une augmentation des taux de phosphorylation des résidus sérine de l'IRS-1 accompagnée d'une augmentation de l'activité de JNK suite à l'incubation des cellules *Fao* en présence de tunicamycine ou de thapsigargine. Ces résultats sont supportés par des observations issues des souris génétiquement obèses et insulino-résistantes (*ob/ob*) où l'on retrouve une activité de JNK significativement élevée en comparaison avec des souris contrôles [197]. À l'inverse, l'inhibition de l'activité de JNK par un inhibiteur synthétique (SP600125) [23] contrecarre la phosphorylation des résidus sérine de l'IRS-1 induite par le stress du RE [197]. En somme, ces résultats suggèrent que la présence d'un stress du RE hépatique contribue au développement de l'insulino-résistance hépatique associé à l'obésité, médiée par la voie d'IRE-1/JNK/IRS1 (Fig. 1.20).

#### *La SHNA et le stress du RE hépatique*

La réponse au stress du RE hépatique a récemment été étudiée dans de modèles de lésions hépatiques induites par une accumulation de lipides au foie (ex. : la SHNA). Par exemple, le recours à divers modèles d'induction de la stéatose hépatique par des diètes i.e. riches en lipides saturés ou polyinsaturés et riches en sucrose, chez des rats a permis de caractériser les conséquences de la composition de la diète sur le métabolisme du RE hépatique.

#### *La composition de la diète et le stress du RE*

Wang et al. [278] ont montré que malgré des contenus de TAG hépatiques identiques, une augmentation (~2 fois) de la quantité protéique de GRP78 et de l'expression génétique de XBP-1 dans le foie étaient constatées strictement chez les rats nourris avec une diète riche en lipides saturés en comparaison aux rats nourris avec une diète riche en lipides polyinsaturés. Ces auteurs ont aussi rapporté des résultats similaires chez les rats nourris avec une diète riche en sucrose [278]. La SHNA résultant de l'induction des diètes riches en lipides saturés et en sucrose se caractérise par une accumulation de lipides saturés au foie ainsi qu'au sein de la membrane du RE [278]. Il semble que l'accumulation de lipides saturés au foie affecte directement la morphologie et l'intégrité du RE, ce qui en altère les fonctions. Ainsi, Borradaile et al. [26] ont montré que l'incu-

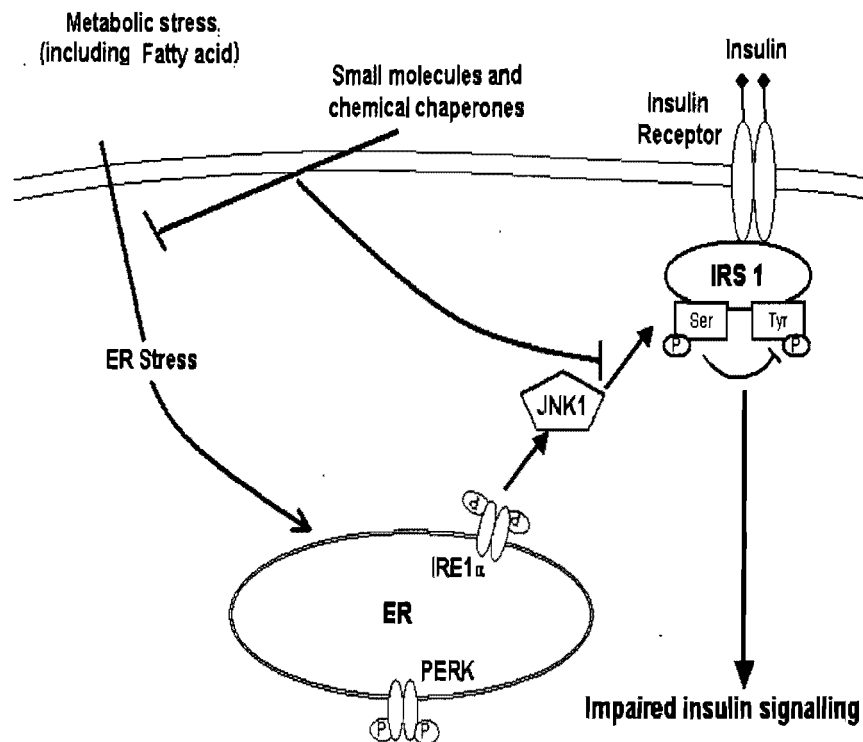


Figure 1.20 – Le stress du RE hépatique et l'inhibition de la voie de l'insuline. La phosphorylation de l'IRE1, un marqueur moléculaire du stress du RE, mène à l'activation de la JNK, qui à son tour phosphoryle les résidus sérine sur l'IRS-1 et cause une atténuation de l'activation de la cascade de la signalisation de l'insuline. IRS-1, *Insulin Receptor Substrate 1*; IRE1, *inositol requiring enzyme 1*; PERK, *PKR-like kinase*; ER, réticulum endoplasmique; JNK,; Ser, Sérine; Tyr, Tyrosine. Adapté de [258].

bation de cellules *Chinese hamster ovary* (CHO) en présence de palmitate a augmenté le contenu en lipides saturés retrouvé dans la membrane du RE. De plus, ces auteurs ont remarqué une distension du RE mesurée par microscopie, et une redistribution de la protéine chaperon GRP78 du RE vers le cytosol chez ces cellules CHO [26].

Dans le même ordre d'idées, Ota et al. [195] ont étudié les effets *in vitro* de la présence d'acides gras monoinsaturés (acide oléique) et d'une émulsion de TAG (*Intralipid*) sur l'induction du stress du RE hépatique. L'incubation des hépatocytes McA-RH7777 en présence d'acide oléique de même qu'avec l'*Intralipid* a augmenté l'expression génétique et le contenu protéique de la GRP78 ainsi que les taux de phosphorylation de l'eIF2 $\alpha$ , en comparaison aux contrôles. D'autre part, des résultats similaires sont rapportés lors de l'infusion de d'acide oléique chez des souris C57BL/6 en comparaison à l'infusion de saline [195].

#### *Inhibition de l'activité de la MTP*

L'inhibition de l'activité de la MTP est un autre modèle d'induction de la SHNA utilisé afin d'étudier les conséquences de l'accumulation de lipides hépatiques (voir section 1.2.2.2 *MTP et production de VLDL hépatiques*). Liao et al. [165] ont étudié l'effet de l'inhibition pharmacologique de l'activité de la MTP chez des souris C57BL/6 de même que chez des souris hyperbétalipoprotéïnémiques *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces auteurs ont rapporté que malgré une augmentation de l'accumulation (~4 fois) de TAG hépatiques, aucun changement n'a été remarqué au niveau de l'expression de la protéine chaperon GRP78 au foie chez ces souris en comparaison aux contrôles.

Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'induction du stress du RE par les lipides semble différent entre les modèles nutritionnels et pharmacologiques de SHNA. L'accumulation des lipides au foie provenant de sources exogènes telles la diète, l'incubation ou l'infusion de lipides, paraissent causer davantage des lésions hépatocytaires menant au développement d'un stress du RE, en comparaison à l'accumulation intrinsèque des lipides résultant de l'inhibition de l'activité de la MTP.

#### *Le facteur de transcription SREBP et le stress du RE*

La réponse UPR chronique peut résulter en une augmentation du facteur de transcription de gènes lipogéniques tel le SREBP [135], qui en retour altère l'homéostasie

lipidique et contribue au développement d'une SHNA [136] (Fig. 1.21). Le mécanisme exact liant l'activation de SREBP par le stress du RE hépatique n'est pas complètement élucidé. Toutefois il a été postulé que l'activation de la lipogenèse via le SREBP lors du stress du RE serait peut être due à l'IR induite par le stress du RE (*i.e.* via IRE-1/JNK/IRS1).

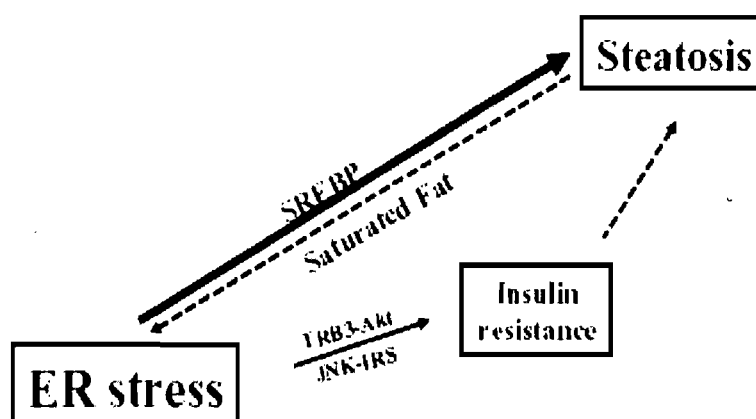


Figure 1.21 – Relation hypothétique entre la présence d'un stress du RE hépatique, l'IR et la SHNA. L'augmentation de l'accumulation de lipides saturés au foie contribue au développement du stress du RE hépatique, en retour le stress du RE hépatique a été associé à l'induction du facteur de transcription de gènes impliqués dans la lipogenèse, le SREBP, ainsi qu'au développement de l'IR par la voie de IRE-1/JNK/IRS. Adapté de Ji et al. [135]

#### *Traitements contre le stress du RE hépatique*

Des travaux récents réalisés chez l'animal montrent qu'une diminution de la réponse UPR est bénéfique dans l'amélioration de la réponse à l'insuline chez des animaux diabétiques. Ainsi, Nakatani et al. [190] ont montré que la surexpression de la protéine chaperon *oxygen regulated protein* (OPR150) au niveau du foie de la souris *db/db* diminue la réponse UPR et améliore la sensibilité hépatique à l'insuline. Similairement, Ozcan et al. [198] ont montré qu'un traitement aux protéines chaperons chimiques par administration orale (ex. : acide 4-phényl butyrique et acide ursodésoxycholique) diminue le stress du RE hépatique et restaure la sensibilité à l'insuline au foie [198]. De plus,

le contenu de TAG hépatiques était significativement diminué chez ces souris traitées en comparaison aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la réponse UPR par la surexpression génétique ou par un traitement chimique a des effets bénéfiques sur l'atténuation du stress de RE hépatique et sur l'amélioration de l'IR et de la SHNA.

### 1.3.3 L'entraînement et le stress du RE

Les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur le développement de la SHNA mènent à penser que la pratique de l'exercice puisse activer la synthèse de protéines chaperons par l'augmentation de la voie UPR. Cependant, il n'existe dans la littérature aucune étude ayant été conduite dans le but de déterminer les effets de l'entraînement sur la réponse UPR hépatique dans des modèles d'induction de la SHNA. Il existe par contre des évidences expérimentales indiquant que l'entraînement physique pourrait avoir des effets sur la réponse UPR au niveau des muscles squelettiques et du cerveau.

Une augmentation de 2,5-3 fois des taux d'expression protéiques de la protéine chaperon GRP78 dans le *soleus* et *extensor digitorum longus* a été observée suite à un entraînement physique sur tapis roulant de trois mois chez des rats en comparaison aux rats sédentaires. L'entraînement s'avère également bénéfique dans l'amélioration de certains phénotypes pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Dans leur étude, Um et al. [273] ont évalué l'effet d'un entraînement physique sur tapis roulant d'une durée de 16 semaines chez un modèle murin de la maladie. Ces auteurs ont rapporté une augmentation significative des taux protéiques de GRP78 au cerveau de ces souris suite au programme d'entraînement. D'autre part, les seules évidences expérimentales sur la réponse UPR au foie proviennent de l'étude du rôle de l'exercice aigu. Gonzalez et al. [99] ont investigué les effets d'une séance d'exercice aigu (50 minutes) sur le stress du RE hépatique chez des rats. Ces auteurs ont rapporté une augmentation (~2 fois) du taux protéique de la GRP78 mesuré immédiatement après la séance d'exercice en comparaison aux rats sédentaires. De plus, les concentrations protéiques de la GRP78 demeuraient élevées jusqu'à 4 heures post-exercice [99].

Les mécanismes par lesquels l'entraînement physique augmente la réponse UPR aux

muscles squelettiques et au cerveau, de même que celle au foie ne sont pas clairs. Cependant, il est connu que l'entraînement physique induit des changements musculaires (ex. : augmentation de la capacité oxydative et du nombre de capillaires) ainsi que des dommages musculaires, contribuant ainsi à l'adaptation métabolique des fibres musculaires en réponse à de nouvelles demandes fonctionnelles. De ce fait, l'augmentation de la réponse UPR peut être considérée comme une forme de protection en réponse à la demande accrue de la synthèse de protéines observée lors des périodes d'adaptations musculaires. D'autre part, l'augmentation de la réponse UPR chez le patient Alzheimer pourrait induire une résistance des neurones aux agressions induites par le stress du RE. Finalement, puisque le foie joue un rôle essentiel dans l'organisme, particulièrement dans le métabolisme énergétique (*i.e* production de glucose) ainsi que dans la sécrétion de protéines (*i.e* l'apoB), une augmentation adéquate de la réponse UPR est donc nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'hépatocyte.

## CHAPITRE 2

### ARTICLES

#### 2.1 Objectifs généraux et spécifiques

La SHNA résulte d'un désordre au niveau du métabolisme lipidique et mène à l'accumulation chronique de lipides au sein des hépatocytes en l'absence d'une consommation excessive d'alcool [70]. Les mécanismes contributifs au développement de la SHNA regroupent d'une part, l'augmentation de l'importation d'acides gras non estérifiés et de la lipogenèse *de novo* au foie, et d'autre part, l'augmentation inadéquate de la capacité oxydative des lipides et de la production de lipoprotéines hépatiques [159].

Donnelly et al. [67] ont montré qu'environ 60% des TAG hépatiques chez les patients SHNA proviennent de la réestérification d'AGNE circulants et que l'accroissement du taux de lipolyse adipocytaire semble contribuer davantage à l'importation accrue d'AGNE au niveau du foie. Puisque l'entraînement diminue significativement les concentrations d'AGNE plasmatiques chez des rats soumis à une diète riche en lipides [89, 90], ces résultats nous ont mené à l'élaboration de l'hypothèse que la diminution des AGNE plasmatiques notée chez les animaux entraînés et soumis à un régime riche en lipides serait possiblement reliée en partie à la diminution de la lipolyse adipocytaire. De plus, nous avons tenté d'évaluer un facteur pouvant réguler la lipolyse adipocytaire : la régionalisation lipolytique au niveau de deux dépôts adipeux (viscéral et non-viscéral).

Dans la continuité de ce premier projet, nous avons ciblé l'étude un mécanisme d'élimination des lipides hépatiques pouvant contribuer au développement de la SHNA : l'exportation des lipides hépatiques par la production de VLDL hépatiques. Généralement, on retrouve une augmentation de la production de VLDL hépatiques mais insuffisante pour compenser l'accumulation de lipides au foie, ce qui semble contribuer à l'accumulation de lipides hépatiques chez des sujets SHNA et des modèles génétiques du développement de la SHNA chez les animaux. Puisque les VLDL hépatiques contribuent fortement à l'augmentation des taux de TAG en circulation, et que l'entraînement physique

améliore les taux de TAG plasmatiques [97, 116, 150], il ne serait donc pas surprenant que la production de VLDL hépatiques soit diminuée suite à un programme d'entraînement. Ces constatations nous ont mené à l'élaboration de notre deuxième projet qui avait pour but d'étudier les effets d'un entraînement sur la production hépatique de VLDL et de déterminer s'il y avait une relation avec le contenu protéique de la molécule-clé qui régule la production de VLDL : la microsomal triglyceride transfer protein (MTP).

Bien que la SHNA soit principalement associée à l'obésité et au diabète de type 2, elle est également liée à des perturbations cellulaires comme le stress du RE hépatique. Le stress du RE hépatique a récemment été détectée au sein de modèles de SHNA chez les animaux [197]. D'autre part, un groupe de chercheurs ont montré qu'un traitement aux protéines chaperons chimiques par administration orale diminuait le stress du RE hépatique chez des souris obèses *ob/ob* [198]. Les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur le développement de la SHNA mène à penser que la pratique de l'exercice puisse activer la synthèse de protéines chaperons par l'augmentation de la voie UPR. Ces résultats nous ont mené à l'élaboration de notre dernier projet : l'évaluation des effets de l'entraînement sur la voie UPR chez un modèle d'accumulation de lipides hépatiques induite par l'inhibition de la production de VLDL hépatiques via l'inhibition de l'activité de la MTP hépatique.

L'objectif des études qui composent cette thèse était donc d'évaluer les effets de l'entraînement en endurance sur une voie d'accumulation (i.e. lipolyse adipocytaire) et une voie d'élimination de lipides au foie (i.e. production de VLDL hépatiques), ainsi que sur le stress du RE hépatique chez des modèles du développement de la SHNA chez les rats.



## **2.2 Article 1**

**Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat fed rats.**

Chapados, N.<sup>1</sup>, Collin, P.<sup>1</sup> Imbeault, P.<sup>2</sup> Corriveau, P. <sup>1</sup> and Lavoie, J-M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Department of Human Kinetics, University of Ottawa, Canada.

Article publié dans le British Journal of Nutrition, 2008 Sep ;100(3) :518-25.

Exercise training decreases *in vitro* stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat fed rats

Chapados, N.<sup>1</sup>, Collin, P.<sup>1</sup> Imbeault, P.<sup>2</sup> Corriveau, P. <sup>1</sup> and Lavoie, J-M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Department of Human Kinetics, University of Ottawa, Canada.

Running title : Lipolysis in exercise trained HF fed rats

Mailing proofs : Dr. Jean-Marc Lavoie

Département de kinésiologie

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-7044

Fax : (514) 343-2181

e-mail :



**ABSTRACT** The purpose of the present study was to determine the effects of an exercise training programme in high-fat fed rats on *in vitro* lipolysis in a visceral (mesenteric) and a non-visceral fat depot (retroperitoneal) and its relation to perilipin content. Two groups of female rats were fed a high-fat diet (42% as kcal) for 8 wk, one remaining sedentary (Sed) and the other being exercise trained (Tr) for this entire period. Rats were sacrificed after 2 and 8 wk. of their respective treatment. The significantly ( $P < 0.01$ ) higher levels in mesenteric and retroperitoneal fat pad weights, plasma leptin, non-esterified fatty acid, and glucose observed with time in Sed high-fat fed rats were significantly ( $P < 0.05$ ) attenuated in Tr animals. Isoproterenol stimulated ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) lipolysis in the mesenteric, but not in the retroperitoneal tissue, was significantly ( $P < 0.05$ ) lower ( $\sim 57\%$ ) in Tr than in Sed rats after 8 wk of high-fat feeding. The isoproterenol stimulated lipolysis in the mesenteric tissue of 8-wk Tr high-fat fed rats was lowered to the level measured in 2-wk fat fed rats although mesenteric fat accumulation was still significantly ( $P < 0.01$ ) higher in 8- than in 2-wk Tr rats. Perilipin content (Western blot) was not affected by the exercise training program. These results indicate that exercise training resulted in a reduction in the high-fat diet-induced elevated levels of lipolysis in the mesenteric tissue. This response appears to be independent of the perilipin content.

**Key words** : non-esterified fatty acids ; perilipin ; isoproterenol-induced lipolysis ; leptin ; fat mass

## INTRODUCTION

When present in excess, plasma non-esterified fatty acids (NEFA) are involved directly in the pathogenesis of metabolic disturbances leading to insulin resistance and the metabolic syndrome (Stich Berlan, 2004). It has been suggested in animal as well as human studies that increased fat accumulation inside the adipocyte results in an increased lipolysis, thus resulting in increased plasma NEFA levels (Scheen Luyckx, 2002). Regulation of lipolysis, especially in the visceral compartment (Bosello Zamboni, 2000), is, therefore, important for the prevention of systemic metabolic disorders.

Since the typical Western diet is very high in fat, high-fat diet regimens have been used frequently in animals as a model of obesity (Kraegen et al., 1989; Ghibaudi et al., 2002) and more recently as a model to study the short-term development of obesity (Gauthier et al., 2003; Gauthier et al., 2004). It is generally assumed that a high-fat diet regimen leads to an increased basal and stimulated adipocyte lipolysis, thus contributing to increased plasma NEFA levels (Berger Barnard, 1999; Collin et al., 2006). On the other hand, exercise training has been reported to significantly reduced adipocyte fat accretion and plasma NEFA levels whether conducted concurrently or initiated during the course of a high-fat diet-induced obesity (Gauthier et al., 2003; Gauthier et al., 2004). Stimulated lipolysis in adipocytes has been shown to be increased by exercise training in lean human (subcutaneous tissue) and animal (Bukowiecki et al., 1980; Crampes et al., 1986) under normal feeding conditions. Whether basal and/or stimulated adipocytes lipolysis is also increased with exercise training under high-fat diet conditions is not known. It would be metabolically more appropriate if exercise training, under high-fat diet conditions, would result in a decrease instead of an increase in lipolysis. In this regard, it is revealing that in pinealectomized rats, in which adipocytes lipolytic response to isoproterenol is increased, exercise training resulted in a decrease in this elevation in

the epidymal fat pad (Borges-Silva et al., 2005). The main purpose of the present study was to test the hypothesis that exercise training in high-fat fed animals is associated with a reduction in adipocyte lipolysis. This was tested in a visceral (mesenteric) and in a non-visceral (retroperitoneal) fat tissue. Visceral fat (i.e. omental, mesenteric) is usually associated more strongly with metabolic abnormalities such as dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, and type 2 diabetes than is subcutaneous or total body fat (Votruba and Jensen, 2007). Catecholamine-induced rate of NEFA mobilization from visceral fat cells is accelerated due to elevated rate of lipolysis in human obesity, mainly because of an increased beta 3-adrenoceptor function, and a decreased alpha 2-adrenoceptor function. This promotes an increased release of NEFA to the portal system, which may contribute to the parallel metabolic disturbances observed in upper-body obesity (Lönngqvist et al., 1995). A reduction in the elevated lipolysis, especially in the mesenteric tissue with exercise training in high-fat fed rats would, therefore, constitute an asset in reducing the increased amount of NEFA reaching the portal system.

In recent years, a new component regulating the activity of hormone-sensitive lipase (HSL)-mediated lipolysis has been identified. Perilipins are phosphoproteins in adipocytes localized at the surface of the lipid droplet (Greenberg et al., 1991). There is evidence that the access of HSL to the lipid droplets is determined by perilipin A, the main isoform of perilipin (Londos et al., 1999 ; Brasaemle et al., 2000). Increased basal lipolysis in high-fat fed rats may result from an increase in HSL mass or activity ; alternatively, this increase may reflect the absence of a protective coat of perilipin on the lipid droplet (Tansey et al., 2001). There is no information on the action of exercise training on perilipin in adipocytes. It has previously been suggested that exercise training might alter the amount of perilipin thereby regulating the interaction of HSL with its substrate (Nomura et al., 2002). In an effort to better understand how lipolysis may be affected by exercise

training in high-fat fed rats, we measured perilipin protein content and try to associate it with changes in *in vitro* lipolysis in the mesenteric tissue.

## METHODS

**Animal care.** Female Sprague-Dawley strain rats (n= 45), Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 180-200g upon their arrival were housed individually and had ad libitum access to food and tap water. Their environment was controlled in terms of light (12 :12-h light-dark cycle starting at 6 :00 AM), humidity and room temperature (20-23 °C). All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care.

**Diet and exercise protocol.** A few days after their arrival, all animals were assigned to a high-fat diet while remaining sedentary or being submitted to an exercise training program for 2 or 8 wks (n = 9 rats/group). Another group of rats were immediately sacrificed to provide for basal values (T = 0, n = 6-9). The HF diet consisted of 42% lipid (80% lard, 20% corn oil), 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal) and was provided in small pellets from ICN Pharmaceuticals (NY, USA). Details of this diet have been presented elsewhere (Gauthier et al., 2003). The exercise training programme was introduced concomitantly to the high-fat diet. Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times/wk for the duration of the experiment. During the first 2 wk, rats were progressively run from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope up to 30 min/day at 26 m/min, 4 % slope. Thereafter, the training program was progressively increased to reach 60 min at 26 m/min, 10% slope for the last 4wk. All Tr animals were restrained from training 48 h before sacrifice.

**Blood and tissue sampling.** At the end of their respective experimental condition, all animals were weighed and sacrificed between 08 :30 and 10 :30 AM. Food was removed from the animals at least 2 h before sacrifice. After complete anaesthesia (sodium pento-

barbital, 50 mg/kg, ip), the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was rapidly (<45 s) drawn from the abdominal vena cava (~4 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (4000 RPM for 10 min, 4 °C) and the plasma kept for NEFA, glucose, insulin, and leptin determinations. The mesenteric and retroperitoneal fat depots were, thereafter, rapidly excised and weighed. Mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastro-intestinal tract from the gastro-oesophageal sphincter to the end of the rectum with special care taken in distinguishing and removing pancreatic cells. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. Approximately 700 mg of the depots was immediately used for determination of lipolysis. The remaining portions of the mesenteric and retroperitoneal depots as well as plasma samples were stored at -78 °C until analyses.

**Preparation of isolated adipocytes.** Adipocytes were isolated according to the method of Rodbell (Rodbell, 1964). Tissue fragments (700 mg) from the mesenteric and the retroperitoneal tissue were minced in polyethylene vials containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer in the presence of 1 mg/ml collagenase P (Roche 1213865). Krebs-Ringer bicarbonate buffer also contained fatty acid-free bovine serum albumin 4% (BSA) and 0.5 g/L glucose (KRBA). Thereafter, the atmosphere of the flasks was saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Adipocytes were then incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min with a shaking frequency of 100 strokes/min. The digested pieces were filtered through a nylon mesh for separation of fat cells from the stroma. The filtrate was collected in a graduated polyethylene tube to avoid cell breakage. The aqueous phase was aspirated with polyethylene pipettes. The floating adipocytes were then resuspended in 5 ml of fresh KRBA. This process was repeated 3 times to eliminate the remaining collagenase. The adipocytes were stored in the KRBA for 2 min between 2 washes.

**Incubation of adipocytes and measurement of lipolysis.** Basal and stimulated lipolysis were determined in isolated adipocytes (50  $\mu$ L) incubated with a 10  $\mu$ L solution of KRBA buffer and ascorbic acid (basal) and with isoproterenol adjusted to give concentrations of  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ , and  $10^{-4}$  M. Isoproterenol was used because it is a pure  $\beta$ -agonist and as such it elicits the greatest lipolytic response (Berger Barnard, 1999). Isoproterenol produced a dose-dependent increase in lipolysis, with the maximal responses (plateau) reached at  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M. In agreement with other groups, adenosine deaminase was not added to the incubation medium to block the anti-lipolytic action of adenosine (Coe et al., 1999; Iglesias-Osma et al., 2004). The incubation was performed at 37 °C under a 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with gentle shaking (80 strokes/min) for 2 h. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L HCl (1N), and then 50  $\mu$ L NaOH (1N) to neutralize the medium. The vials were vortexed and put on ice for 10 min. After a centrifugation of 5 s at 250 g, the aqueous phase was removed and stored at -78 °C until glycerol determination. Lipolytic activity was measured by glycerol quantification with the use of commercially available kits from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Glycerol quantification was expressed in millions of cells/h after counting the number of cells in each tested sample.

**Cell count.** The number of cells in each individual sample was determined by first diluting 100  $\mu$ L of the isolated adipocyte preparation into 9.9 ml KRBA (100  $\mu$ L) and then dropping 50  $\mu$ L of this solution in 25  $\mu$ L of trypan blue (0.4% normal saline). The total number of cells in this final suspension was determined with the use of a Nikon-optiphot microscope (10X) and with *Image-Pro plus* version 4.5 (Media Cybernetics).

**Measurement of perilipin content.** Mesenteric fat depots ( $\sim$  100 mg) were homogenized in EDTA-sucrose buffer and centrifuged at 12,000 g, 4 °C for 20 min. The infranatant was collected with a blunt-tipped Pasteur pipette and stored at -80 °C until



perilipin determination. Perilipin A content in adipocytes was determined by Western blotting. All samples (25 of proteins) were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel followed by protein transfer to a polyvinylidene difluoride membrane by electroblotting. The membrane was blocked in 5% (wt/vol) skim milk in TBS (100 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7.5) for 2 h at room temperature before overnight incubation with a rat perilipin A polyclonal antibody (ABR-Affinity Bio Reagents) with 0.05% sodium azide. After three washes in TBS-Triton 0.5%, the membrane was incubated for 1 h with an anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated antibody (Jackson Immuno Research Laboratories Inc) diluted to 0.8  $\mu\text{g/ml}$  in 0.1% BSA, 0.1% Tween 20 and 1% (wt/vol) skim milk in TBS. The membrane was washed three times for 10 min each time in TBS-Triton 0.5% before a chemifluorescence substrate (enhanced chemiluminescence, Amersham, Baie D'Urfée, PQ) was applied to the membrane. The resulting signal was detected on enhanced chemiluminescence film (Amersham), scanned with the use of Agfas Arcus II, and quantified with Imagepro 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and expressed as arbitrary units.

**Analytical procedures.** Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma insulin levels were measured with commercially available kits from MP Biomedicals, LLC (Orangeburg, NY, USA). Plasma NEFA levels were measured with commercially available kits from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Leptin levels were measured with commercially available kits from Linco (St-Charles, Missouri, USA).

**Statistical analysis.** Values are expressed as means  $\pm$  S.E. Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA for non-repeated-measures design with exercise training and time as main effects at times 2 and 8 wk, excluding time point 0 (since no diet treatment was given at that time). In a second step, the effect of time was analyzed se-

parately in Sed and Tr rats using a one-way ANOVA for non-repeated measures over all time points using the same values at time 0 for both groups. This second statistical analysis was performed to better characterize the effect of time in each condition including comparison with time 0. Fisher's post-hoc test was used in the event of a significant ( $P < 0.05$ ) F ratio.

## RESULTS

Changes in body composition and metabolic characteristics of Tr and Sed rats are presented in Table 2.I. The increase in body weight over time ( $P < 0.01$ ) was similar in trained and sedentary rats. The increase in the weight of the mesenteric and the retroperitoneal fat pads, however, was higher ( $P < 0.05$ ) in Sed than in Tr rats after 8 wk of high-fat feeding. The same observation was made for plasma leptin levels, with higher ( $P < 0.05$ ) values found in Sed than in Tr animals (Table 1). Plasma NEFA and glucose levels were also higher ( $P < 0.01$ ) with time in both Tr and Sed rats, but to a significantly ( $P < 0.05$ ) larger extent in Sed than in Tr animals. Plasma insulin levels were higher ( $P < 0.01$ ) with time in both Tr and Sed rats (8 wk).

Basal as well as stimulated lipolysis levels were higher with time ( $P < 0.01$ ) in the mesenteric tissue of Sed animals (Fig. 2.1). In Tr rats, basal lipolysis in the mesenteric tissue was not affected with time, while stimulated lipolysis was higher ( $P < 0.01$ ) compared to time 0 but to a lesser extent than what is observed in Sed animals (Fig.2.1). As a result, the elevation in stimulated lipolysis ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) in the mesenteric tissue was lower ( $P < 0.05$ ) in Tr than in Sed animals (wk 8 ; 2.1). In the retroperitoneal tissue, however, stimulated lipolysis ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) in Tr animals was increased to the same level as in Sed animals after 8 wk, thus resulting in an absence of effects of training on lipolysis.

Perilipin content in the mesenteric tissue expressed in arbitrary units was higher ( $P$

<0.05) after 2 wk in both Sed and Tr animals and decreased to initial values after 8 wk (Fig. 2.3A). This response was not significantly affected by the exercise training program. When perilipin content was expressed per unit of fat pad weight, significantly lower ( $P < 0.01$ ) levels were found after 8 wk compared to basal levels in both Sed and Tr animals (Fig. 2.3B).

### DISCUSSION

In agreement with previous studies conducted in high-fat fed rats (Kraegen et al., 1989; Gauthier et al., 2003; Gauthier et al., 2004), exercise training in the current study resulted in a significant reduction in fat accumulation in the mesenteric and the retroperitoneal tissues along with lower levels of plasma NEFA and leptin (wk 8; Table 2.I). In line with these observations, the most novel finding of the present study is that the high-fat-induced increase in isoproterenol-stimulated lipolysis in the mesenteric tissue was reduced by 8 wk of concurrent exercise training. This response is rather surprising considering that exercise training is generally associated with an increase, and not a decrease in *in vitro* and *in vivo* stimulated adipose tissue lipolysis in normal dietary conditions (Bukowiecki et al., 1980; Crampes et al., 1986; Enevoldsen et al., 2000). The fact that the elevation in stimulated lipolysis was reduced by training in HF fed rats might, at first glance, simply reflect a reduction in fat mass in the mesenteric tissue. As mentioned by others (Enevoldsen et al., 2000), this will not decrease the interest of the study since the reduction in fat mass is an effect of training. Most interestingly, however, stimulated lipolysis in the mesenteric tissue of 8wk Tr rats was lowered to the level measured in 2 wk old rats even though fat accumulation was still  $\sim 75\%$  higher in the former. This indicates that the large reduction in stimulated lipolysis in 8 wk Tr rats cannot solely be attributed to the reduction in fat mass. Exercise training may act upon stimulated lipolysis in the mesenteric tissue of high-fat fed rats so as to contribute to limit the amount of

circulating NEFAs resulting from daily sympathetic nerve activity. We previously reported that concurrent exercise conducted in high-fat fed rats reduced plasma NEFA levels and completely prevented the HF-diet-induced hepatic steatosis (Gauthier et al., 2003). Taking into account that plasma NEFA levels reflect whole body lipolysis, the present data extend these findings by being the first to indicate that under conditions of high-fat feeding exercise training reduced the elevation in isoproterenol-stimulated lipolytic activity of the mesenteric adipose tissue.

Although the present decrease in the elevation of isoproterenol-induced lipolysis with exercise training in the mesenteric tissue of high-fat fed rats seems surprising, a similar finding has been recently reported in pinealectomized rats in which the absence of melatonin increased lipolysis (Borges-Silva et al., 2005). Interestingly, the authors suggest that melatonin is necessary for the balance between lipogenesis and lipolysis of the adipocytes in response to physical training in rats. Although the molecular mechanism remains to be clarified, it is possible that exercise training under a high-fat feeding condition increased the lipogenic capacity of the visceral adipocytes to the detriment of lipolysis.

The interest of the present finding that exercise training reduced the elevation in stimulated lipolysis in the mesenteric tissue of high-fat fed rats is exacerbated by the fact that the same observation was not made in the retroperitoneal tissue. Stimulated lipolysis in the retroperitoneal tissue was increased by  $\sim 95\%$  ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M) following 8 wk of HF feeding. However, these increased lipolytic values were not affected by the exercise training program (Fig. 2.2). In interpreting these data, it is important to recall that the retroperitoneal tissue, although considered an intra-abdominal tissue, is not a visceral tissue as the intraperitoneal mesenteric depot (Cinti, 2005). Accordingly, the high-fat feeding protocol increased stimulated lipolytic activity to a greater extent in the

mesenteric (~10 folds) than in the retroperitoneal tissue (~2 folds ; Fig. 2.12.2) although relative fat accumulation was higher in the retroperitoneal than in the mesenteric tissue (~7 vs 4 folds). The greater lipolytic response of the mesenteric tissue in response to the high-fat diet may be part of the explanation as to why exercise training specifically decreases lipolysis in this tissue in this dietary condition. In one of the rare study that looked at the effects of exercise training on lipolysis in various adipose tissues in normally fed rats, exercise training did increase epinephrine stimulated lipolysis in the retroperitoneal tissue but not in the mesenteric tissue, indicating that these two adipose tissues respond differently to exercise training under normal feeding conditions (Enevoldsen et al., 2000). Altogether, it seems that the effects of exercise training on reducing the elevation in lipolytic activity in high-fat fed rats are particularly observed in the mesenteric tissue suggesting that this effect might be specific to this visceral adipose tissue.

**Basal lipolysis.** Opposite of what was found in the sedentary condition (wk 8), exercise training did not result in higher levels of basal lipolysis in the mesenteric tissue compared to values at times 0 and 2 wk (Fig.2.1). Interpretation of basal lipolysis in the present study is complicated by the fact that the data were acquired in an *in vitro* situation, which may not reflect the normal basal *in vivo* conditions. This situation is not as important when lipolysis is stimulated by pharmacological agents since the stimulation overcomes the normal *in vivo* environment of the cells. Actually, several *in vitro* findings related to stimulated lipolysis have been confirmed by *in vivo* measurements (Enevoldsen et al., 2000). Notwithstanding the limitation of the *in vitro* measurements, the absence of high rate of basal lipolysis in the mesenteric tissue of trained rats fed a HF diet would be highly beneficial on a metabolic point of view by potentially decreasing the circulating levels of NEFA reaching the liver in the resting state and potentially reducing liver fat accumulation. It is not clear if exercise training affect basal lipolysis in normally

fed individuals and animals. Exercise training has been reported to be without effect or may reduced basal lipolysis in some fat depots in normally fed animals (Enevoldsen et al., 2000 ; Nomura et al., 2002). The present data are, however, the first to indicate that exercise training limits the increase in basal *in vitro* lipolysis in the mesenteric fat depot of high-fat fed rats.

**Exercise and visceral adipose tissue in humans** It is well documented that visceral fat constitutes an important risk factor for the development of metabolic abnormalities and cardiovascular diseases in humans (Votruba and Jensen, 2007). Exercise training decreases visceral fat and this is associated with an improvement in glucose disposal and insulin sensitivity (Ross et al., 2000). Recent evidence suggests that the improvement in insulin sensitivity with exercise training may be explained by a decreased availability of NEFA (Shojaee-Moradie et al., 2007). A reduction in lipolytic activity of the visceral fat depot with exercise training could, therefore, contribute to the reduced availability of NEFA to the portal system and to the improvement in insulin sensitivity in obese persons.

**Lipolysis and perilipin.** It is not readily apparent as to what mechanism might explain the exercise training-induced attenuation in the lipolytic activity of the mesenteric tissue in the present high-fat fed rats. Plasma glucose and insulin were increased to a similar extent in Sed and Tr animals after 8 wk of HF feeding. Nomura et al., 2002 observing that basal activity of HSL was greater in TR normally fed rats, but basal lipolysis was not, recalled the suggestion of a dual mechanism of lipolytic activation of lipolysis involving that some factor on the surface of the lipid droplets (i.e. perilipin) may be necessary for the hormonal stimulation of lipolysis (Wise Jungas, 1978). In an attempt to explore this mechanistic avenue, perilipin content was measured in the mesenteric tissue of the present Tr and Sed animals. Interestingly, our data indicate a transient increase in

perilipin content in absolute values after 2 wk that decreased to initial values after 8 wk (Fig. 2.3A). This resulted in low perilipin content in relation to fat mass accretion after 8 wk (Fig. 2.3B). Since perilipin has been reported to be involved in the mechanism of stimulation of lipolysis (Enevoldsen et al., 2000 ; Enevoldsen et al., 2001), the low level of perilipin expressed per unit of fat mass after 8 wk may explain the increase in lipolysis in the present HF fed rats kept in the sedentary state. It is not clear what caused the decrease in perilipin content after 8 wk of HF feeding. It could be related to the increased plasma leptin levels. Mice overexpressing leptin show a reduction in perilipin gene expression in white adipose tissue (Ke et al., 2003). On the other hand, and most importantly, exercise training did not significantly affect perilipin content in the mesenteric tissue, whether reported in absolute or in relative values. The association between perilipin content and lipolysis is, however, complicated by the fact that other factors in addition to HSL and perilipin may contribute to the lipolytic response (Sztalryd et al., 2003). The new enzyme adipose triglyceride lipase (ATGL), that catalyzes the initial step in triglyceride hydrolysis in mammalian adipose tissue, along with the adipocytes lipid binding proteins (ALBP) that interact with HSL favoring the translocalisation from cytosol to lipid droplet, are potential candidates (Zimmermann et al., 2004 ; Carmen Victor, 2006).

In summary, results of the current study indicate that exercise training lowers the elevation in stimulated *in vitro* lipolytic activity in the mesenteric tissue of rats concurrently fed with a high-fat diet. This effect was not observed in a non-visceral tissue (retroperitoneal) and seems to be independent of the perilipin content. Whether exercise training may decrease the lipolytic activity of the visceral adipose tissue of established obese individuals and thus constitute a health promoting effect remains to be established.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JML) and from the Canadian Institutes of Health Research (JML and PI) of Canada.



Tableau 2.I –

High-fat feeding period		0wks		2wks		8wks	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Body weight (g)	Sed	236	3.0	277 <sup>**</sup>	3.6	352 <sup>** ††</sup>	13.2
	Tr			283 <sup>**</sup>	4.8	350 <sup>** ††</sup>	12.3
Mesenteric fat pad (g)	Sed	3.33	0.24	5.5	0.3	13.2 <sup>** ††</sup>	1.4
	Tr			5.5 <sup>*</sup>	0.37	9.6 <sup>** †† ‡</sup>	1.0
Retroperitoneal fat pad (g)	Sed	1.24	0.14	3.6 <sup>**</sup>	0.31	9.4 <sup>** ††</sup>	0.66
	Tr			3.13 <sup>**</sup>	0.25	6.8 <sup>** †† ‡</sup>	0.69
Leptin (ng/l)	Sed	1.27	0.2	3.26 <sup>**</sup>	0.25	6.82 <sup>** ††</sup>	0.39
	Tr			2.44 <sup>†</sup>	0.25	5.51 <sup>** †† ‡</sup>	0.53
Plasma NEFA (mM)	Sed	0.16	0.01	0.29 <sup>**</sup>	0.04	0.38 <sup>**</sup>	0.05
	Tr			0.29 <sup>**</sup>	0.01	0.25 <sup>** ‡</sup>	0.04
Glucose (mM)	Sed	5.15	0.45	7.05 <sup>**</sup>	0.24	7.82 <sup>**</sup>	0.21
	Tr			7.31 <sup>**</sup>	0.21	6.69 <sup>††</sup>	0.53
Insulin (pmol)	Sed	69.3	14	44	11	177 <sup>††</sup>	51
	Tr			238 <sup>** ††</sup>	18	240 <sup>**</sup>	33

Values are reported as means  $\pm$  SE (n = 7-9 rats/groups). All rats were fed a high fat diet. Sed : sedentary ; Tr : trained ; BW : body weight. \* Significantly different from baseline values (time 0 wk), P<0.05 ; \*\* P <0.01. † Significantly different from values at time 2 wk, P <0.05. †† P <0.01. ‡ Significantly different from Sed counterpart, P <0.05, ‡‡ P <0.01.

## LEGENDS

Fig. 2.1. Adipocyte lipolysis in mesenteric adipose tissue of sedentary (Sed) and trained (Tr) rats at time 0 wk (baseline values) and in response to 2 and 8 weeks of high-fat feeding. Values are expressed as glycerol production per million of cells per hour (h) in the basal state and in response to isoproterenol ( $10^{-7}$ -  $10^{-4}$  M) after 2 h of incubation. Values are means  $\pm$  SE; n = 7-9 rats/group, n = 6 at time 0. <sup>†</sup> Significantly different between Sed and Tr rats, P <0.05. \* Significantly different from baseline values (time 0 wk), P <0.01. <sup>†</sup> Significantly different from values at time 2 wk, P <0.05.

Fig. 2.2. Adipocyte lipolysis in retroperitoneal adipose tissue of sedentary (Sed) and trained (Tr) rats at time 0 wk (baseline values) and in response to 2 and 8 weeks of high-fat feeding. Values are expressed as glycerol production per million of cells per hour (h) in the basal state and in response to isoproterenol ( $10^{-7}$ -  $10^{-4}$  M) after 2 h of incubation. Values are means  $\pm$  SE; n = 7-9 rats/group, n = 6 at time 0. \* Significantly different from baseline values (time 0 wk), P <0.05. <sup>†</sup> Significantly different from values at time 2 wk, P <0.05.

Fig. 2.3. Perilipin content and perilipin/fat ratio measured in mesenteric tissue from sedentary (Sed) and trained (Tr) rats at time 0 wk (baseline values) in response to 2 and 8 weeks of high-fat feeding. Values are means  $\pm$  SE; n = 8-9 rats/group, n = 6 at time 0 wk. + Significantly different from baseline values (time 0 wk), P <0.05, ++ P <0.01. <sup>†</sup> Significantly different from values at time 2 wk, P <0.05, <sup>††</sup> P <0.01. Perilipin was measured by Western blotting and expressed in arbitrary units (AU). Perilipin/fat ratio was obtained by dividing the perilipin content by the absolute weight (g) of the mesenteric depot.

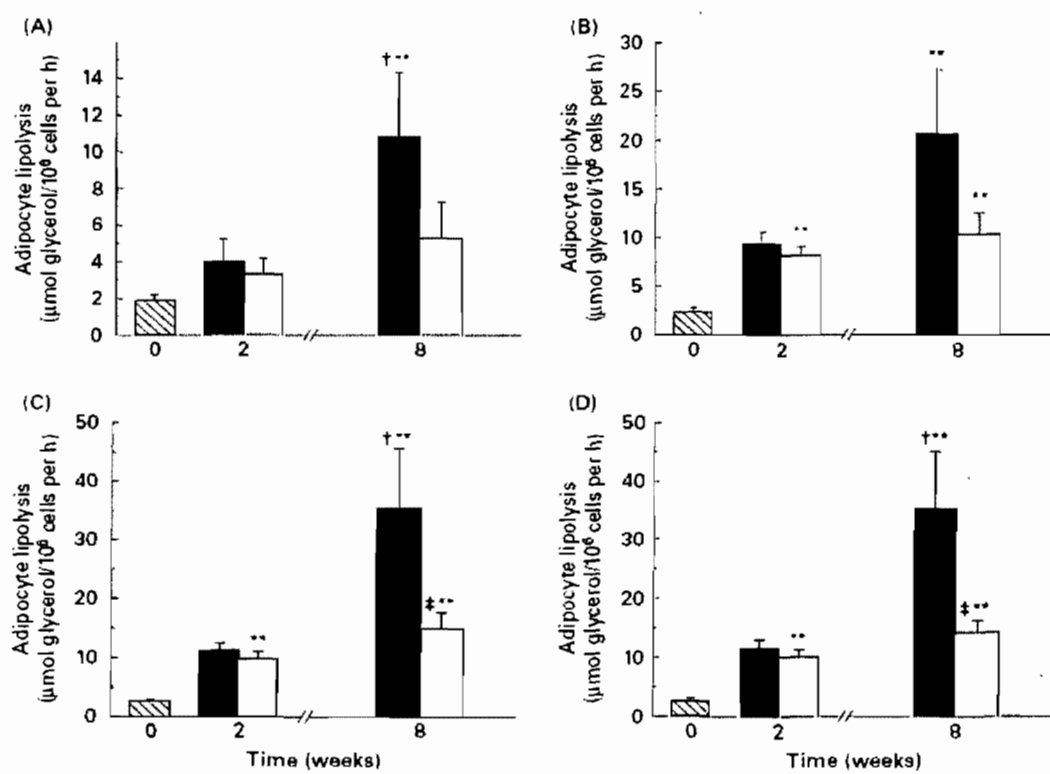


Figure 2.1 –

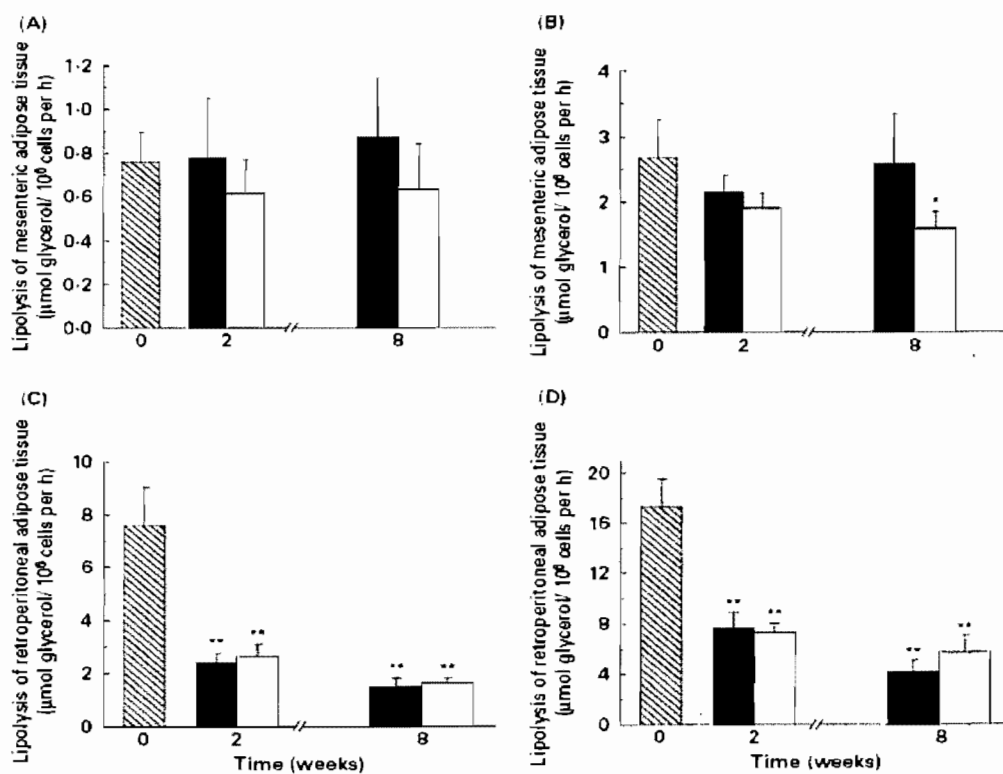


Figure 2.2 -

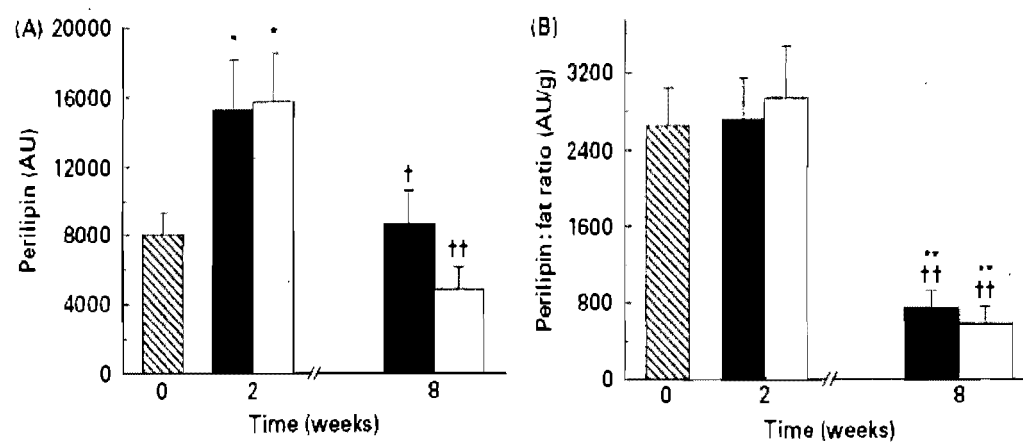


Figure 2.3 –

## REFERENCES

- Berger JJ Barnard RJ (1999) Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol* 87, 227-232.
- Borges-Silva CN, Fonseca-Alaniz MH, Alonso-Vale MI, Takada J, Andreotti S, Peres SB, Cipolla-Neto J, Pithon-Curi TC Lima FB (2005) Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. *J Pineal Res* 39, 178-184.
- Bosello O Zamboni M (2000) Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 1, 47-56.
- Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR Londos C (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275, 38486-38493.
- Bukowiecki L, Lupien J, Follea N, Paradis A, Richard D LeBlanc J (1980) Mechanism of enhanced lipolysis in adipose tissue of exercise-trained rats. *Am J Physiol* 239, E422-429.
- Carmen GY Victor SM (2006) Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18, 401-408.
- Cinti S (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.
- Coe NR, Simpson MA Bernlohr DA (1999) Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res.* 40, 967-972.
- Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P Lavoie JM (2006) Time course of changes in *in vitro* lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr* 96, 268-275.

Crampes F, Beauville M, Riviere D, Garrigues M (1986) Effect of physical training in humans on the response of isolated fat cells to epinephrine. *J Appl Physiol* 61, 25-29.

Enevoldsen LH, Stallknecht B, Fluckey JD, Galbo H (2000) Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E585-592.

Enevoldsen LH, Stallknecht B, Langfort J, Petersen LN, Holm C, Ploug T, Galbo H (2001) The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. *J Physiol* 536, 871-877.

Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM (2004) Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1064-1071.

Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM (2003) Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 94, 2127-2134.

Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ (2002) Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* 10, 956-963.

Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266, 11341-11346.

Iglesias-Osma MC, Garcia-Barrado MJ, Visentin V, Pastor-Mansilla MF, Bour S, Prevot D, Valet P, Moratinos J, Carpenne C (2004) Benzylamine exhibits insulin-like effects on glucose disposal, glucose transport, and fat cell lipolysis in rabbits and diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 1020-1028.

Ke Y, Qiu J, Ogus S, Shen W-J, Kraemer FB, Chehab FF (2003) Overexpression of leptin in transgenic mice leads to decreased basal lipolysis, PKA activity, and perilipin levels. *Biochem Biophys Res Comm* 312, 1165-1170.

Kraegen EW, Storlien LH, Jenkins AB James DE (1989) Chronic exercise compensates for insulin resistance induced by a high-fat diet in rats. *Am J Physiol* 256, E242-249.

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP Kimmel AR (1999) Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10, 51-58.

Lönnqvist F, Thöme A, Nilsell K, Hoffstedt J, Arner P (1999) A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoreceptors in obesity. *J Clin Invest* 95, 1109-1116.

Nomura S, Kawanami H, Ueda H, Kizaki T, Ohno H Izawa T (2002) Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 236-242.

Rodbell M (1964) Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239, 375-380.

Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, Hudson R Janssen I (2000) Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 133, 92-103.

Scheen AJ Luyckx FH (2002) Obesity and liver disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 703-716.

Shojaee-Moradie F, Baynes KC, Pentecost C, Bell JD, Thomas EL, Jackson NC, Stolinski M, Whyte M, Lovell D, Bowes SB, Gibney J, Jones RH Umpleby AM (2007) Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose



metabolism. *Diabetologia* 50, 404-413.

Stich V Berlan M (2004) Physiological regulation of NEFA availability : lipolysis pathway. In *Proc Nutr Soc*, pp. 369-374.

Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR Londos C (2003) Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161, 1093-1103.

Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR Londos C (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6494-6499.

Votruba SB, Jensen MD (2007) Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism. *Ann Rev Nutr* 27, 149-163.

Wise LS Jungas RL (1978) Evidence for a dual mechanism of lipolysis activation by epinephrine in rat adipose tissue. *J Biol Chem* 253, 2624-2627.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.

## 2.3 Article 2

### **Effect of exercise training on hepatic microsomal triglyceride transfer protein in rats.**

Natalie Ann Chapados<sup>1</sup>, Marilia Seelaender<sup>2</sup>, Emile Levy<sup>3</sup>, and Jean-Marc Lavoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Molecular Biology of the Cell Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo

Brazil, 05508-900. <sup>3</sup> Research Center, Sainte-Justine Hospital and Department of Nutrition,

University of Montreal. Montreal, Canada, H3T 1C5.

Article publié dans Hormone and Metabolic Research, Horm Metab Res. 2008 Nov 20. (Epub ahead of print)

EFFECTS OF EXERCISE TRAINING ON HEPATIC MICROSOMAL  
TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN CONTENT IN RATS

Natalie Ann Chapados<sup>1</sup>, Marilia Seelaender<sup>2</sup>, Emile Levy<sup>3</sup>, and Jean-Marc Lavoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Molecular Biology of the Cell Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo  
Brazil, 05508-900.

<sup>3</sup> Research Center, Sainte-Justine Hospital and Department of Nutrition, University of  
Montreal, Montreal, Canada, H3T 1C5.

**Running title :** Exercise training and hepatic MTP protein

Correspondent author : Natalie Chapados

Department of Kinesiology


University of Montreal

C.P. 6128, Succ. Centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6111 (4867)

Fax : (514) 343-2181

e-mail : 

## ABSTRACT

Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) is a protein that exerts a central regulatory role in very-low density-lipoprotein (VLDL) assembly and secretion. The purpose of the study was to investigate the effects of an exercise training program on hepatic content of MTP and its relation to hepatic VLDL-triglyceride (-TG) production in response to lipid infusion. Female rats either fed a standard (SD) or an obesity-induced high-fat (HF; 43% as energy) diet for 8 wk were subdivided into sedentary (Sed) and trained (Tr) groups. Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill 5 times/wk for 8 wk. At the end of this period, all rats in the fasted state were intravenously infused with a 20% solution of Intralipid for 3h followed by an injection of Triton WR1339 to block lipoprotein lipase. An additional control group consisting of Sed rats fed the SD diet was infused with saline (0.9% NaCl). Plasma TG accumulation was thereafter measured during 90 min to estimate VLDL-TG production. Under HF diet, hepatic MTP content and plasma TG accumulation after Triton blockade (thus reflecting VLDL-TG synthesis and secretion) were not changed in Sed rats, whereas liver TG content was highly increased ( $\sim 90\%$ ;  $P < 0.01$ ). On the other hand, training reduced liver MTP protein content in both SD (-18%) and HF (-23%) fed rats ( $P < 0.05$ ). Plasma VLDL-TG accumulation was also lower ( $P < 0.05$ ) in Tr than in Sed rats fed the HF diet. This effect was not observed in SD fed rats. Furthermore, the exercise training-induced decrease in VLDL-TG production in HF rats was associated with a decrease in liver TG levels. It is concluded that in addition to a reduction in liver TG content, exercise training reduces VLDL synthesis and/or secretion in HF fed rats probably via MTP regulation.

**Key words :** hepatic steatosis, high-fat diet, VLDL-TG production, lipid infusion

## INTRODUCTION

During the last decades, the rate of obesity has considerably increased and become one of the most serious public health concerns of the 21<sup>st</sup> century [1]. Obesity is associated with a high risk of developing metabolic disturbances such as dyslipidemia [1], type 2 diabetes [2], and cardiovascular diseases [3]. In this regard, there has been a recent increasing interest for the significance of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is strongly linked to obesity which development is favored by caloric overconsumption and physical inactivity [4,5]. High-fat-diet induced regimens in sedentary rats lead to obesity accompanied by hepatic lipid infiltration leading to hepatic steatosis [6,7]. Furthermore, there is indication that fat in the liver rather than in skeletal muscle is associated with features of the metabolic syndrome such as increased fasting serum TG and hyperinsulinemia [8].

NAFLD may result from an increased uptake of lipids by the liver, an increased hepatic *de novo* lipogenesis [9], a decreased fatty acid -oxidation [10,11], and/or a decreased synthesis and/or secretion of very-low-density lipoproteins (VLDLs) [12,13]. In other respects, it has been reported that exercise training results in an improvement in hepatic steatosis in humans [14] and in an attenuation [15], reversal [16] or complete suppression [17] in rats. Mechanisms by which exercise training may reduce hepatic steatosis include a decrease in non-esterified fatty acid (NEFA) mobilization from mesenteric adipose tissue [18], an increased hepatic fatty acid oxidation [15] and a reduced lipogenesis [15,19] in rats. In human, hepatic VLDL-triglyceride (-TG) secretion rate has been recently reported to decrease following exercise training [20]. However, the effects of exercise training on the underlying mechanisms that regulate hepatic VLDL-TG secretion remain poorly defined.

VLDL assembly is a complex mechanism that involves several regulatory molecules

including diacylglycerol acyltransferase-1 and -2, ADP-ribosylation factor 1, phospholipase D, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) [21]. MTP plays a central regulatory role in VLDL assembly and secretion. Specifically, MTP is a heterodimeric protein complex localized within the endoplasmic reticulum. It has been proposed that MTP shuttles lipids from the endoplasmic reticulum (ER) membrane to the growing apoB chain in the ER, allowing the protein to be preserved from proteosomal degradation and its complete translocation into the lumen, thus favoring VLDL assembly and secretion [21]. An increased MTP expression in type 2 diabetic mice [22] and wild-type mice overexpressing MTP [23] leads to VLDL-TG overproduction, while MTP deficient mice show significantly reduced secretion rates of VLDL-TG and low plasma TG levels [24]. Moreover, the development of hepatic steatosis has been linked to MTP deficiency [24], polymorphism [25] as well as administration of a MTP inhibitor [26].

The purpose of the present study was to investigate the effects of an exercise training program on hepatic MTP protein content and its relation to hepatic VLDL-TG production in response to lipid infusion. Since high-fat diets (HF) are well known to stimulate hepatic fat accumulation and represent a good model of obesity in rats [6,7], these experiments were conducted in groups fed a standard (SD) and a HF diet.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Ethical approval.** All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care after institution approval.

**Animal care.** Female Sprague-Dawley strain rats (Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 180-200g upon their arrival were housed individually and had ad libitum access to food and tap water. Their environment was controlled in terms of light (12 :12-h light-dark cycle starting at 6 :00 AM), humidity and room temperature (20-23°C).

**Diet and exercise protocol.** A few days after their arrival, animals were divided in 2 groups either fed a SD or a HF diet. Rats in each one of these two dietary conditions were sub-divided into sub-groups of rats either remaining sedentary (Sed) or being submitted to an exercise training program (Tr) for 8 wk. The HF diet consisted of 43% lipid (80% lard, 20% corn oil), 38% carbohydrate, and 19% protein (kcal) and was provided from Harlan, Teklad (WI, USA). The SD diet (12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3% protein ; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Canada, Woodstock, ON). Details of the diets have been presented elsewhere [17]. The exercise training program consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times/wk for the duration of the experiment. During the first 4 wk, rats were progressively run from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope up to 30 min/day at 26 m/min, 4 % slope. Thereafter, the training program was progressively increased to reach 60 min at 26 m/min, 10% slope for the last 4wk. All Tr animals were restrained from training 48 h before sacrifice.

**Surgical procedures.** Rats were anesthetized with 1.4 ml/kg body weight of ketamine (61.5 mg/ml) and xylazine (7.6 mg/ml). A vertical incision made in the front of the neck permitted the location and the insertion of a cannula into the right jugular. Briefly, a polyethylene tubing (catalog number 427411, 0.58-mm inner diameter X 0.97-mm outer diameter, Becton Dickinson) filled with saline-heparin (5U /ml) was inserted into the jugular vein and the distal extremity was tunnelled subcutaneously and exteriorized at the nape of the neck. The catheter was glued in place using Vet Bond (3M Animal Care Products) and all incisions were sutured closed. Once in place, the catheter was filled up with a 30% glycerol in heparin-saline (5U/ml) solution to keep them patent. Rats were allowed 3-day post-operative recovery before being submitted to the experimental procedures.

**Infusion study.** Since an increased flux of lipids to the liver stimulates VLDL secretion in mice [27] and in humans [28], VLDL-TG production in the present study was measured after an intravenous fat infusion. Food was removed from cages at least 12 h before sacrifice. On the morning of the experiment, catheters were connected through polyethylene tubing to a KDS100 syringe infusion pump (KD Scientific Inc, New Hope PA). The infusion line was suspended above the cage and permitted the rat complete freedom of movement. Rats received a 3-h intravenous infusion of 20% Intralipid (Baxter Corporation, Sherbrooke, Canada) at a rate of 0.4 ml/h. Blood was withdrawn from the jugular vein at different time points during the experiment. A sub-group of Sed rats fed the SD diet, from now on referred to as control, was submitted to all testing procedures except that they were infused with saline (0.9% NaCL) instead of Intralipid.

**Determination of in vivo TG secretion.** After the 3-h lipid or saline (control group) infusion, rats received an intravenous injection of Triton WR1339 (500mg/kg) (25301-02-4, Sigma-Aldrich) diluted in saline. Triton WR1339 is a non ionic detergent that effectively blocks lipoprotein lipase activity in vivo and therefore inhibits VLDL hydrolysis. Using this approach, plasma TG accumulation over time can be used as a measurement of liver TG secretion. Blood samples were collected in precooled tubes containing EDTA (15%) as anticoagulant at the end of the lipid infusion (preinjection) and at 30, 60 and 90 min after the Triton WR1339 injection. Plasma was immediately separated by centrifugation and used for plasma TG determination.

**Blood and tissue samplings.** At the end of the experiment and after complete anaesthesia with ketamine (61.5 mg/ml) and xylazine (7.6 mg/ml), the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was rapidly (<45 s) drawn from the abdominal vena cava (~4 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (3000 RPM for 10 min, 4°C) and the plasma kept for



NEFA, glucose, and insulin. The liver was excised, the median lobe immediately snap-frozen used for triacylglycerol determination. The mesenteric, retroperitoneal, urogenital and subcutaneous fat depots were, thereafter, rapidly excised and weighed. The plasma samples were stored at -78 °C until analyses.

**Microsomal Triglyceride Transfer Protein Western Blotting.** Briefly, 100mg of liver was homogenized in TPER containing protease inhibitors (10  $\mu$ /ml pepstatin, and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100U Trasylol) using a polytron and centrifuged at 12,000 g, 4°C for 10 min. The infranatant was collected with a blunt-tipped Pasteur pipette and stored at -80°C until MTP determination. MTP content in the liver was determined by Western blotting. All samples (10  $\mu$ g of proteins) were separated on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred onto Hybond-Cextra nitrocellulose membranes (Amersham). Membranes were blocked overnight in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST 0.05%) and 5% nonfat dry milk at 4°C. The blot was then incubated with an anti-rabbit MTP antibody (kindly provided by Dr David Gordon, Bristol-Myers-Squibb) for 60 min at room temperature. After two washes in TBST (0.05%) and two washes in TBST (0.05%) containing 0.5% nonfat dry milk, the membrane was incubated for 30 min with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit,-mouse IgG (Bm chemiluminescence Western Blotting Kit, cat.no. 11520709001, Roche Diagnostics) at room temperature. Then the membrane was washed four times for 15 min each time in TBST (0.05%) before a chemiluminescence substrate (cat.no. 11520709001, Roche Diagnostics) was applied to the membrane. The resulting signal was detected on scientific imaging films (Amersham) and the image was acquired with the use of Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation). The bands were quantified with Scion Image 4.0.2 software (Scion Corporation) and expressed as arbitrary units. Equal protein loading was determined using mouse anti-SS-actin primary antibo-

dies (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA).

**Analytical procedures.** Plasma TG levels were determined with an enzymatic colorimetric assay available from SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA). Liver TG concentrations were estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by using commercial kits from SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA). Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma insulin levels were measured with commercially available kits from MP Biomedicals, LLC (Orangeburg, NY, USA). Plasma NEFA levels were measured with commercially available kits from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

**Statistical analysis.** Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA for non-repeated measures using diet and training as the main effects at common time points, excluding control group (since no exercise and diet treatments were given at that time). In a second step, data was further analyzed to include comparisons of all experimental groups with the control group at common time points using a one-way ANOVA for non-repeated measures. Fisher's PLSD post-hoc test was used in the event of a significant ( $P < 0.05$ ) F ratio.

## RESULTS

The HF diet resulted in higher total body weight and fat accumulation in mesenteric, retroperitoneal and urogenital tissues ( $P < 0.01$ ; 2.II). Mesenteric, retroperitoneal and urogenital fat pad weights were lower ( $P < 0.01$ ) in Tr than in Sed rats regardless of the diet. Plasma insulin levels were lower ( $P < 0.05$ ) in Tr compared to Sed rats in both dietary conditions while no significant changes were observed in plasma glucose concentrations. A difference in insulin levels at  $P < 0.06$  was found between HF-Sed and control group (Table 1).

### **Plasma NEFA and hepatic TG**

Plasma NEFA levels were lower in all groups 90 min after the Triton injection (Fig. 2.4). Hepatic TG levels were higher ( $P < 0.01$ ) in HF than in SD fed rats. HF fed rats had higher ( $P < 0.01$ ) liver TG levels in the Sed state compared to the control group, which was not the case for the HF-Tr animals (Fig. 2.4).

### **VLDL-TG production and secretion**

To estimate the effect of training and/or high fat diet on hepatic VLDL-TG synthesis and secretion at the end of the lipid infusion period, the lipoprotein lipase was momentarily blocked with Triton WR-1339 injection. The resulting accumulation of TG in plasma reflected the hepatic output of VLDL-TG. There were no significant effects of diet and training on plasma TG levels response at each time with the exception of the lower ( $P < 0.05$ ) values measured at time 30 in the HF compare to SD diet (Fig. 2.5). However, when the 4 experimental groups were compared to the control group at each time, significantly ( $P < 0.05$ ) higher values of plasma TG levels were found at time 0, 30 ( $P < 0.01$ ) and 90 min in all groups, with the exception of the HF-Tr group, thus indicating a lowering effect of training on plasma TG levels in HF fed rats. In addition, the only group showing an absence of difference from control group when the plasma VLDL-TG area under the curve over time was computed was the HF-Tr group (Fig. 2.5).

### **MTP protein content**

Hepatic MTP content expressed in arbitrary units was not affected by the HF diet but was lower in Tr compared to Sed animals in both diets ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2.6).

## DISCUSSION

The interest in evaluating MTP protein content following exercise training is enlightened by the fact that MTP plays a pivotal role in the assembly and secretion of VLDL-TG from the liver [21]. In humans, the absence of MTP is observed in the rare autosomal recessive condition of abetalipoproteinemia, a genetic defect in lipoprotein biosynthesis [29]. A similar phenotype is found in heterozygous MTP knockout mice [24]. In the present study, we report data showing that exercise training decreased liver MTP protein content in both the SD and HF fed animals. We measured an 18 and 25% decrease in hepatic MTP content with training in SD and HF fed rats, respectively, when compared to Sed rats. This is in line with a recent report showing a decrease in MTP mRNA with training in male Wistar rats [30]. The present findings constitute the first reported evidence that exercise training results in MTP protein content adaptations associated with a potential reduction in VLDL synthesis and exportation by the liver in HF fed rats.

### Effect of the HF diet on plasma VLDL-TG

Using the same approach as recently described by Zhang et al. [27], VLDL-TG production by the liver was estimated by the measurement of plasma TG accumulation during 90 min following a 3h infusion of lipids followed by an injection of Triton to inhibit VLDL clearance. As expected, we observed an increased accumulation of plasma TG (~6- to 10-folds) in all groups in the 90 min post-injection period. When statistical analyses were conducted using only the four experimental groups, the only significant comparison found was lower plasma TG levels in HF fed rats at time 30 min. There was no effect of the HF diet when total area under plasma TG curve over time was considered. On the whole, these data provide evidence that hepatic VLDL-TG production is not enhanced in HF fed rats in response to a lipid infusion. In addition, we did not find

any effect of the HF diet on the MTP protein content in liver. This does not rule out the possibility that VLDL-TG production is increased by a HF diet on a long term basis. It does, however, indicate that the acute management of a lipid load in terms of VLDL-TG production is not increased in liver of HF fed animals. This is in line with other instances where the flux of fatty acids was increased, causing steatosis, without any evidence for increase in VLDL production [31]. These results suggest that the availability of fatty acids is not the only determinant of the acute rate of hepatic VLDL-TG production. Hepatic TG accumulation, on the other hand, was highly increased in the HF fed animals. These data support previous reports indicating that following a period of ingestion of a HF enriched diet, lipids accumulate to a large extent in the liver [6,7]. The present data add to these findings by providing indication that liver lipid accumulation in HF fed rats is not due to a reduction of lipid exportation from the liver in the form of VLDL.

#### **Effect of exercise training on plasma VLDL-TG**

Statistical comparisons of the four experimental groups, without the control group, revealed only a tendency for plasma TG accumulation levels to be lower in Tr than in Sed animals. To further analyze these data, we compared all experimental groups to the control group (saline infusion). This analysis revealed significantly higher plasma TG levels in all experimental groups when compared to control, with the exception of the HF-Tr group. This effect was observed at all times with the exception of the 60 min time point. The reduction in plasma TG accumulation with training in HF fed rats was clearly observed when the same analysis was conducted using values for total area under plasma TG values over time. The fact that the reduction in plasma TG levels in exercise trained rats was observed only in HF fed rats coupled to the greater reduction in MTP content in HF than in SD fed animals (25 vs 18%) suggests a synergistic effect of training with the HF diet on VLDL synthesis and/or secretion. Such interdependence of

the diet and exercise was observed in other steps of regulation of liver lipid metabolism including lipogenesis [19]. Alternatively, Lira et al [30] recently reported a decreased in plasma VLDL-TG accumulation and apoB mRNA following Triton injection in Tr male Wistar rats fed a SD diet. This different finding may be related to the strain and sex of the rats and to the fact that plasma VLDL-TG was not measured following lipid infusion in this study. Taken together, the present results indicate that Tr rats submitted to a HF diet depicted lower physiological accumulation of plasma VLDL-TG, that coupled with reduction in MTP protein content strongly suggests a decrease in TG synthesis and exportation from liver in the form of VLDL. Accordingly, acute exercise [32] and training [20] in men had a lowering effect on plasma VLDL-TG by increasing VLDL-TG clearance and decreasing VLDL-TG secretion rate, respectively.

The reduction in plasma VLDL-TG following exercise training in the present HF fed rats raises two questions : how do livers of exercise trained animals deal with the increased arrival of lipids and what mechanism is responsible for the decreased VLDL-TG production? There is good evidence that exercise training conducted concurrently with a HF diet reduced liver TG accumulation [17]. Hepatic TGs in the present HF fed rats were reduced by  $\sim 23\%$  following training. This reduction is particularly revealing considering that liver TG exportation was also reduced by training. This suggests the alternative hypothesis that following training fat oxidation is increased in liver of exercise trained rats. Indeed, recent evidence indicates that fat oxidation is increased in liver of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats [15]. Altogether, it appears that the mechanism by which the liver of exercise trained rats fed a HF diet limits the accumulation of fat is not by increasing exportation but rather by increasing oxidation. It is possible in turn that the reduced liver VLDL-TG exportation induced by regular exercise is a consequence of an increased lipid disposal through oxidation.

The response to the second question related to the mechanism involved in reduced VLDL-TG production following training is most likely related to insulin action in the liver. It is well documented that insulin suppresses the secretion of VLDL particles by the liver [33]. MTP gene expression is also acutely reduced by insulin in cultured liver cells [34]. Accordingly, insulin resistance and diabetes result in increased VLDL-TG secretion in Israeli desert gerbil, a sand rat that appears to be an ideal model of the disease in humans [35]. It is still not quite clear if exercise training improves hepatic insulin sensitivity independently of any reduction in liver fat content. In insulin-resistant conditions, regular aerobic exercise can increase peripheral insulin sensitivity, thereby improving the adverse lipid profile [36,37]. Therefore, it is likely that an improved insulin sensitivity following exercise training in fat-induced insulin resistant liver would result in a decrease in VLDL-TG synthesis and secretion. Although insulin sensitivity was not assessed in the present study, the lower plasma insulin levels observed after training in SD and HF fed animals may be taken as an indication of improved insulin sensitivity.

Since VLDL production is primarily substrate-driven [38], it is thus appropriate to study the hepatic capacity of exercise trained rats to synthesize and secrete VLDL, in response to a lipid infusion. Plasma TG and NEFA levels were higher after the 3h Intralipid infusion than in the control saline-infused group. Increases in plasma NEFA and TG following 20% Intralipid infusion have also been reported by Zhang et al. [27]. These authors speculated that Intralipid TG-NEFA delivered to the liver during the infusion arrived as albumin-bound NEFA after lipolysis in the circulation by either lipoprotein or hepatic lipase. They also mentioned that TG-NEFA may also be taken up by the liver after internalization as particle-associated lipid, probably after the emulsion particles had acquired apoE to become "remnant-like" [27]. In other respects, the estimate of VLDL production by the liver might have been strengthened by measurement of plasma apoB

concentration. This was not possible for technical reasons. Since rats were studied in the fasted state plasma TG under the form of chylomicrons is negligible. Under these circumstances, accumulation of plasma TG is considered a good estimate of liver VLDL secretion [27].

In summary, results of the present study indicate that exercise training in HF fed rats lowers protein expression of liver MTP, a molecule that exerts a central regulatory role in VLDL assembly and secretion. Exercise training in HF fed rats was also associated with lower plasma VLDL-TG accumulation following LPL blockade. Taking together, these data converge to the fact that liver of exercise trained rats adapt to a dietary HF regimen so as to decrease liver TG accumulation and reduce VLDL production. The clinical implication of a reduction of VLDL synthesis and secretion with exercise training on blood lipid profile is complicated by the fact that availability of fatty acids, hepatic steatosis and VLDL production are interdependent. Nevertheless, it is clear that reduction of VLDL synthesis and secretion with exercise training does not result in an accumulation of lipids in the liver as it is the case with several drugs inhibiting MTP activity [39,40].



Tableau 2.II –

	Control	SD diet Sed	Tr	HF diet Sed	Tr
Body weight (g)	279±6	299±12	294±10	341±14 <sup>##†</sup>	336±12 <sup>##†</sup>
Mesenteric fat pad (g/100g)	1.8±0.3	2.4±0.3	1.5±0.1 <sup>**</sup>	3.5±0.3 <sup>##†</sup>	2.1±0.2 <sup>##**</sup>
Retroperitoneal fat pad (g/100g)	1.2±0.1	1.5±0.2	1.1±0.2 <sup>**</sup>	2.4±0.2 <sup>##†</sup>	1.7±0.1 <sup>##**</sup>
Urogenital fat pad (g/100g)	3.7±0.4	3.9±0.3	2.3±0.2 <sup>**†</sup>	5.9±0.5 <sup>##†</sup>	4.4±0.6 <sup>##**</sup>
Subcutaneous fat pad (g/100g)	0.18±0.08	0.14±0.03	0.14±0.01	0.22±0.04	0.16±0.02
Glucose (mM)	9.31±0.45	8.42±0.47	9.24±1.12	10.29±0.58	9.32±0.39
Insulin (pmol)	130.1±16.3	144.3±29.2	111.7±13.1 <sup>*</sup>	182.7±13.3	131.5±28 <sup>*</sup>

Values are means ± SE ; n = 6-8 rats/group, with the exception of HF-Sed rats (n = 11).<sup>##</sup> Significantly different from SD fed rats, P <0.01. <sup>\*</sup> Significantly different from Sed rats, P <0.05. <sup>\*\*</sup> P <0.01. <sup>†</sup> Significantly different from control rats, P <0.05. <sup>‡</sup> P <0.01.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.2.4.** Plasma non-esterified fatty acid (NEFA) and liver triacylglycerol (TG) concentrations measured in sedentary (Sed) and trained (Tr) rats fed a standard (SD) or a high fat (HF) diet before (0 min) and 90 min after the injection of Triton WR-1339 for NEFA and at the end of the experiment for liver TG. Values at time 0 are taken after a 3h infusion of Intralipid in all four experimental groups while the control group (Sed and SD fed) was infused with saline. Values are means SE ; n = 5-7 rats/group with the exception of the HF-Sed group (n = 11). ## Significantly different from SD fed rats,  $P < 0.01$ . † Significantly different from control rats,  $P < 0.05$ . ‡  $P < 0.01$ .

**Fig.2.5.** Plasma triglyceride (TG) concentrations and total area under the plasma triglyceride concentration curves measured in sedentary (Sed) and trained (Tr) rats fed a standard (SD) or a high fat (HF) diet before (0 min) and 90 min after the injection of Triton WR-1339. Values at time 0 are taken after a 3h infusion of Intralipid in all four experimental groups while the control group (Sed and SD fed) was infused with saline. Values are means SE ; n = 6-8 rats/group, with the exception of the HF-Sed group (n = 11). # Significantly different from SD rats,  $P < 0.05$ . † Significantly different from control rats,  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$ .

**Fig.2.6.** Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) content measured in sedentary (Sed) and trained (Tr) rats fed a standard (SD) or a high fat (HF) diet. The four experimental groups received a 3h infusion of Intralipid while the control group (Sed and SD fed) was infused with saline. MTP was measured by Western blotting and expressed in arbitrary units (AU). Values are means SE ; n = 5-7 rats/group. \* Significantly different from Sed rats,  $P < 0.05$

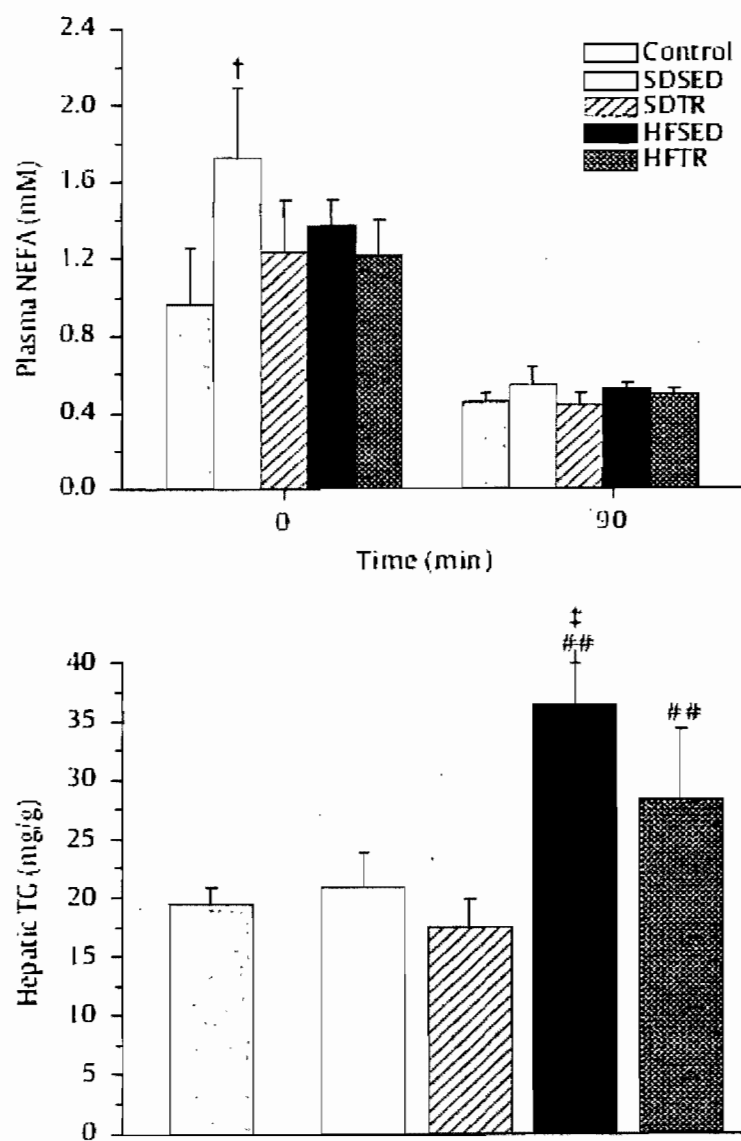


Figure 2.4 –

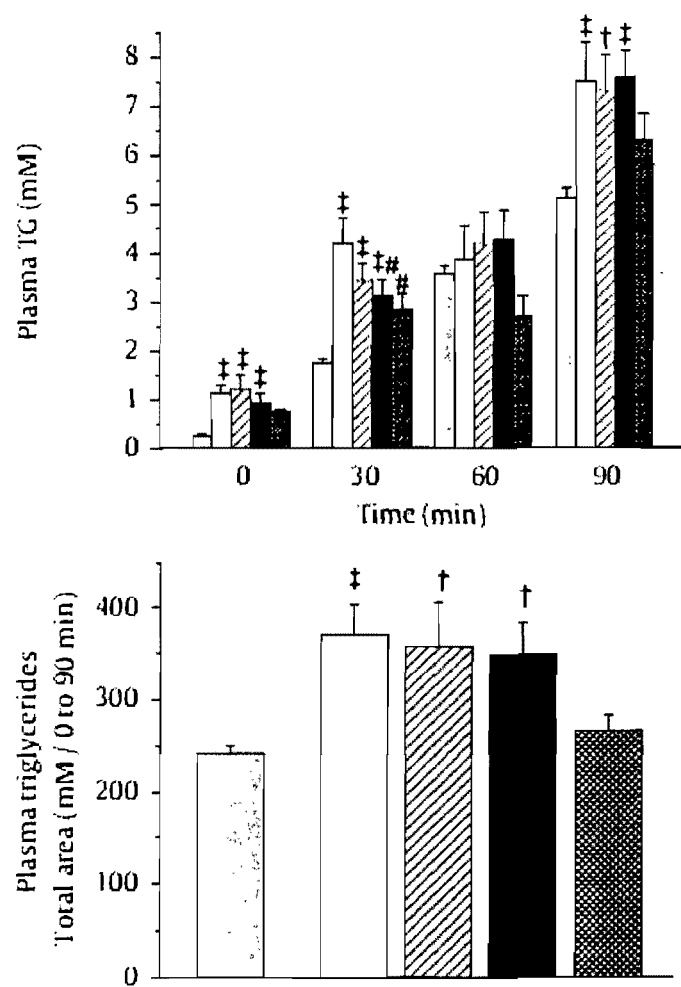


Figure 2.5 –

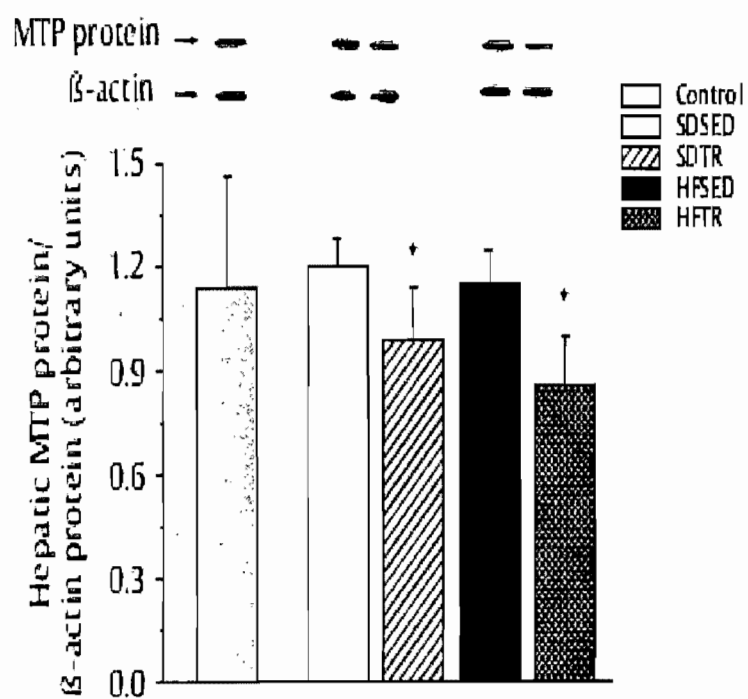


Figure 2.6 –

## REFERENCES

1. Formiguera X, Canton A. Obesity : epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004 ;18 :1125-1146
2. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003 ;289 :76-79
3. Eckel RH, Krauss RM. American heart Association call to action : obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation* 1998 ;97 :2099-2100
4. Hu FB. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids* 2003 ;38 :103-108
5. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients : clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004 ;5 :27-42
6. Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006 ;95 :273-281
7. Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P, Lavoie JM. Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr* 2006 ;96 :268-275
8. Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H. Tissue specificity of insulin resistance in humans : fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2008 ;51 :130-138
9. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005 ;115 :1343-1351
10. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroen-*

terol Hepatol 2007 ;22 :S20-S27

11. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008 ;14 :193-199

12. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002 ;346 :1221-1231

13. Tarugi P, Lonardo A, Ballarini G, Grisendi A, Pulvirenti M, Bagni A, Calandra S. Fatty liver in heterozygous hypobetalipoproteinemia caused by a novel truncated form of apolipoprotein B. *Gastroenterology* 1996 ;111 :1125-1133

14. Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, Angulo P. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2005 ;43 :1060-1066

15. Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 ;294(3) :G619-26

16. Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 ;28 :1064-1071

17. Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 2003 ;94 :2127-2134

18. Chapados N, Collin P, Imbeault P, Corriveau P, Lavoie JM. Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats. *Br J Nutr* 2008 ; 100 :518-525

19. Griffiths MA, Baker DH, Novakofski JE, Ji LL. Effects of exercise training on

diet-induced lipogenic enzymes and body composition in rats. *J Am Coll Nutr* 1993 ;12 :155-161

20. Tsekouras YE, Magkos F, Kellas Y, Basioukas KN, Kavouras SA, Sidossis L. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very low density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 ;295(4) :E851-8

21. Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2004 ;32 :59-64

22. Bartels ED, Lauritsen M, Nielsen LB. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes* 2002 ;51 :1233-1239

23. Tietge UJF, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1999 ;40 :2134-2139

24. Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 1999 ;103 :1287-1298

25. Gambino R, Cassader M, Pagano G, Durazzo M, Musso G. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein : a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in NASH ? *Hepatology* 2007 ;45 :1097-1107

26. Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein : another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003 ;38 :133-140

27. Zhang Y-L, Hernandez-Ono A, Ko C, Yasunaga K, Huang L-S, Ginsberg HN. Regulation of Hepatic Apolipoprotein B-lipoprotein Assembly and Secretion by the Avail-



lability of Fatty Acids : I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J Biol Chem* 2004 ;279 :19362-19374

28. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest* 1995 ;95 :158-166

29. Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, Cattin L, Bertolini S, Calandra S. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia : an ENID review. *Atherosclerosis* 2007 ;195 :e19-27

30. Lira FS, Tavares FL, Yamashita AS, Koyama CH, Alves MJ, Caperuto EC, Batista ML, Jr., Seelaender M. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct* 2008 ;26 :701-708

31. den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis : a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ;24 :644-649

32. Magkos F, Wright DC, Patterson BW, Mohammed BS, Mittendorfer B. Lipid metabolism response to a single, prolonged bout of endurance exercise in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 ;290 :E355-362

33. Sparks JD, Sparks CE. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1990 ;265 :8854-8862

34. Lin MC, Gordon D, Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells : insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res* 1995 ;36 :1073-1081

35. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E. Both insulin resistance and diabetes in *Psammomys obesus* upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ;24 :118-123

36. Lehmann R, Vokac A, Niedermann K, Agosti K, Spinas GA. Loss of abdominal fat and improvement of the cardiovascular risk profile by regular moderate exercise training in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1995 ;38 :1313-1319
37. Mourier A, Gautier JF, De Kerviler E, Bigard AX, Villette JM, Garnier JP, Duvallet A, Guezennec CY, Cathelineau G. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM. Effects of branched-chain amino acid supplements. *Diabetes Care* 1997 ;20 :385-391
38. Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 2000 ;1483 :37-57
39. Chandler CE, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, Vincent J, Harwood HJ. CP-346086 : an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J Lipid Res* 2003 ;44 :1887-1901
40. Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res* 2003 ;44 :978-985

## 2.4 Article 3

**Effects of exercise training on hepatic ER stress induced by microsomal triglyceride transfer protein inhibition in high-fat fed rats.**

Natalie Ann Chapados<sup>1</sup> and Jean-Marc Lavoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

Article soumis à Journal of Applied Physiology

**EFFECTS OF EXERCISE TRAINING ON HEPATIC ER STRESS INDUCED  
BY MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN INHIBITION  
IN HIGH-FAT FED RATS.**

Natalie Ann Chapados<sup>1</sup> and Jean-Marc Lavoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Kinesiology, Université de Montréal, Montreal, Canada

**Running title :** Exercise training and endoplasmic reticulum stress in liver

Correspondent author : Natalie Chapados

Department of Kinesiology

University of Montreal

C.P. 6128, Succ. Centre-ville

Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6111 (4867)

Fax : (514) 343-2181

e-mail



### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of an exercise training program on hepatic ER stress induced by MTP inhibition in rats fed either a standard (SD) or a high-saturated fat diet (HF). Female rats ( $n = 56$ ) fed a SD diet or a high-saturated fat (HF ; 43% as energy) diet for 6 wk were subdivided into sedentary (Sed) and trained (Tr) groups. Exercise training consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill 5 times/wk for 6 wk. At the end of this period, rats were administrated a placebo (P) or a MTP inhibitor (MTPX) solution by daily intraperitoneal injection for 10 consecutive days. In SD diet fed rats, liver triacylglycerol (TAG) levels were  $\sim 16$  and  $\sim 13$  folds higher ( $P < 0.01$ ) in MTPX than in P injected rats in Sed and Tr state, respectively. Similarly, in HF fed rats MTP inhibition increased liver TAG levels by  $\sim 8$  and  $\sim 9$  folds ( $P < 0.01$ ) compared to P in Sed and Tr rats, respectively. Importantly, MTPX injection resulted in an increase ( $P < 0.01$ ) in BiP/GRP78, ATF6, PERK and XBP1 mRNA levels compared to P injected rats exclusively in HF diet groups. Moreover, training further increased BiP/GRP78 mRNA levels, compared to Sed rats, in P and MTPX rats fed the HF diet (27 and 39%, respectively ;  $P < 0.01$ ). It is concluded that : 1) ER stress induced by MTPX occurs only in HF fed rats despite large increase in liver TAG in HF and SD fed animals ; 2) exercise training by intensifying the unfolded protein response (UPR) may constitute a protective mechanism against pharmacologically-induced ER stress.

**Key words : liver fat, exercise, UPR, aspartate transaminase, alanine transaminase, BiP/GRP78.**

## INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) is an intracellular organelle where folding and assembly occur for proteins destined to secretion. Properly folded and assembled proteins transit from the ER and progress down the secretory pathway while incomplete or misfolded proteins are retained to complete the folding process or are degraded (Ellgaard 1999). The folding process is complex and involves several enzymes and molecular chaperones that facilitate protein folding.

Disequilibrium between the ER protein load and protein folding capacity is referred to as ER stress (Foufelle 2007 ; Kaplowitz 2006). Consequently, exceeding the capacity of the folding process leads to the accumulation of unfolded proteins. In order to restore the ER function, ER stress elicits a response defined as unfolded protein response (UPR). Perturbation of the protein folding process is initially sensed by three ER transmembrane sensors : inositol requiring enzyme (IRE-1 $\alpha$ ), activating transcription factor 6 (ATF6) and PKR-like ER-associated protein kinase (PERK). These three sensors are normally inactive due to the binding of ER chaperones which includes glucose regulated protein 78 (GRP78 or BiP), a molecular chaperone that belongs to the heat shock protein 70 (HSP70) class of chaperones. BiP/GRP78 is located in the lumen of the ER where it is expressed constitutively at a basal level and is induced by various factors that stress the ER (Rutkowski 2004). The dissociation between ER chaperones and the transmembrane sensors activates pathways that overcome ER stress such as : 1) upregulation of genes encoding ER chaperone proteins, thus increasing the folding capacity of the ER (*i.e.* ATF6 pathway) ; 2) downregulation of the biosynthetic activity, thus preventing further accumulation of unfolded proteins (*i.e.* PERK pathway) ; 3) degradation of misfolded protein by ER-associated degradation (ERAD) (*i.e.* X box-binding protein 1, XBP1 pathway). When these responses fail to remedy to the overload of misfolded proteins in the

ER, mechanisms leading to apoptosis are activated (*i.e.* CHOP, pathway).

The UPR response plays a crucial role in highly secretory cells such as  $\beta$ -cells and hepatocytes. In humans, inactivation of PERK kinase in the pancreas  $\beta$ -cells leads to development of the Wolcott-Rallison syndrome, a rare autosomal recessive disorder characterized by permanent neonatal or early infancy insulin-dependent diabetes (Delepine et al., 2000). Similarly, development of severe diabetes resulting from destruction of  $\beta$ -cells has been observed in PERK knock-out mice (PERK<sup>-/-</sup>) (Harding et al., 2001). In control mice, increased glycemia stimulates insulin secretion and consequently an UPR response is initiated to limit proinsulin accumulation in the ER. Inactivation of PERK leads to the accumulation of proinsulin in the ER, and consequently induces ER stress and apoptosis in  $\beta$ -cells. Moreover, recent studies have shown that UPR response is upregulated in liver of *ob/ob* mice and mice fed a high-fat diet (Ozcan et al., 2004). Obesity induces ER stress, and this, in turn, plays a central role in the development of insulin resistance and diabetes by triggering JNK activity via inositol requiring enzyme-1 (IRE-1) and inhibition of insulin receptor signaling (Ozcan et al., 2004). Chemical chaperons (Ozcan et al., 2006) and overexpression of protein chaperones decreases UPR response (Nakatani et al., 2005) and improve insulin sensitivity in these obese animals. UPR signal transduction is regulated through a delicate balance between free and bound BiP/GRP78. During ER stress, BiP/GRP78 is induced in order to increase the folding capacity of the ER and to compensate for the depletion of free BiP/GRP78 (Zu 2006).

MTP inhibitors belong to a family of drugs that blocks MTP activity in the assembly and the production of apoB-containing lipoproteins (*e.g.* chylomicrons and hepatic very-low density lipoproteins, VLDL). MTP inhibitors have strong blood lipid-lowering effects and could therefore be used as potential therapeutic agents in reducing blood atherogenic lipoprotein levels in humans (Cuchel 2007). Unfortunately, fat accumula-

tion in the liver has been linked to administration of MTP inhibitors in humans (Cuchel 2007) and animals (Miyazaki 2007 ;Wetereau 1998). Since ER stress response has been observed in the liver of *ob/ob* and high-fat fed mice (Ozcan et al., 2004) and dietary induced NAFLD models in animal models (Wang 2006), MTP inhibitors may be associated with induction of ER stress.

In other respects, exercise training has been shown to improve hepatic steatosis in humans (Suzuki 2005) and to attenuate (Gauthier 2004) or prevent (Rector 2008) chronic lipid infiltration in the liver. However, the effects of exercise training on hepatic ER stress has not been investigated. In the present study we used an MTP inhibitor to potentially induce ER stress. Therefore, the purpose of the present study was to examine the effects of a 6-week exercise training program and MTP inhibition on hepatic ER stress in two dietary rats models. Since high-fat diets are well known to stimulate hepatic fat accumulation and represent a good model of obesity in rats (Gauthier 2006 ; Collin 2006), these experiments were conducted in groups fed a standard (SD) and a high-saturated fat (HF) diet.



## METHODS

**Ethical approval.** All experiments described in this report were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care after institution approval.

**Animal care.** Female Sprague-Dawley strain rats (Charles River, St-Constant, PQ, Canada), weighing 180-200g upon their arrival were housed individually and had ad libitum access to food and tap water. Their environment was controlled in terms of light (12 :12-h light-dark cycle starting at 6 :00 AM), humidity and room temperature (20-23 C).

**Diet and exercise protocols.** A few days after their arrival, animals were divided in 2 groups either fed a SD or a HF diet. Rats in each one of these two dietary conditions were sub-divided into sub-groups of rats either remaining sedentary (Sed) or being submitted to an exercise training program (Tr) for 6 wk. The HF diet consisted of 43% lipid (80% lard, 20% corn oil), 38% carbohydrate, and 19% protein (kcal) and was provided from Harlan, Teklad (WI, USA). The SD diet (12.5% lipid, 63.2% carbohydrate, and 24.3% protein ; kcal) consisted of usual pellet rat chow (Agribrands Canada, Woodstock, ON). The exercise training program consisted of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 5 times per week for the duration of the experiment. During the first 3 weeks, rats progressively ran from 15 min/day at 15 m/min, 0% slope up to 30 min/day at 26 m/min, 4 % slope. Thereafter, the training program was progressively increased to reach 60 min at 26 m/min, 10% slope for the last 3 week. All Tr animals were restrained from training 48 h before sacrifice.

**Injections.** Ten days before the end of the respective interventions, rats either received a placebo (P) or an MTP inhibitor (MTPX) injection. Placebo injection consisted of 1ml/kg of DMSO (25%). MTPX concentration was 1mg/kg diluted in DMSO (25%).

**Blood and tissue samplings.** At the end of their respective experimental conditions,

rats were weighed and food was removed from the animals at least 2 hour before sacrifice. After complete anaesthesia with ketamine (61.5 mg/ml) and xylazine (7.6 mg/ml), the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was rapidly (< 45 s) drawn from the abdominal vena cava ( 4 ml) into syringes pre-treated with EDTA (15%). Blood was centrifuged (3000 RPM for 10 min, 4 °C) and the plasma kept for the measurement of triacylglycerol (TG), glucose, insulin, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT). The liver was excised and the median lobe was immediately snap-frozen and was used for TG determination. The mesenteric, retroperitoneal, urogenital and subcutaneous fat depots were, thereafter, rapidly excised and weighed. The plasma samples were stored at -78 °C until analyses.

**Analytical procedures.** Plasma TG levels were determined with an enzymatic colorimetric assay available from SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA). Liver TG concentrations were estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by using commercial kits from SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA). Plasma glucose concentration was determined with the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Plasma insulin levels were measured with commercially available kits from MP Biomedicals, LLC (Orangeburg, NY, USA). Plasma AST and ALT concentrations were measured with Synchron LX Systems (Beckman Coulter). Insulin resistance was measured using the homeostasis model assessment (HOMA) (fasting insulin ( $\mu$ U/ml)  $\times$  fasting glucose (mmol/l) / 22.5), as previously described (Matthews 1985). Plasma CRP, AST and ALT concentrations were measured with Synchron LX Systems (Beckman Coulter).

**RNA extraction and cDNA preparation.** Quick-frozen tissue samples of the liver were powdered with cold mortar and pestle, and approximately 100 mg was used for the isolation of RNA. Total RNA was extracted by the guanidine thiocyanate method and

mRNA purified using PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Total RNA were reverse transcribed in a final volume of 100  $\mu$ L using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described by the manufacturer. Reverse transcribed samples were stored at -20°C. A reference RNA (Human reference total RNA, Stratagene, Ca) was also transcribed in cDNA.

**qPCR Reactions- ABI Gene Expression Assay - Endogenous controls.** Gene expression level was determined using primer and probe sets from Applied Biosystems (ABI Gene Expression Assays). PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2  $\mu$ l of cDNA samples (20-50 ng), 5  $\mu$ l of the Express qPCR SuperMix (Invitrogen), 0.5  $\mu$ l of the TaqMan® Gene Expression Assays (20X) and 2.5  $\mu$ l of water in a total volume of 10  $\mu$ l. The following pre-developed TaqMan® assays were used as endogenous control : GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TBP (TATA binding protein), HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) and ACTB (Beta actin).

**TaqMan reactions using Universal Probe Library.** Gene expression level was also determined using primer and probe sets from Universal ProbeLibrary from Roche, a fast, specific and flexible format for quantitative real-time PCR. PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2  $\mu$ l of cDNA samples (50 ng), 5  $\mu$ l of the Express qPCR SuperMix (Invitrogen), 2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ M of the Universal TaqMan probe in a total volume of 10  $\mu$ l. The primer sets that served to generate amplicons are presented in Table 2.III.

**Detection and analysis.** The ABI PRISM®7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed FAST with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 5 seconds

at 95°C and 30 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TBP (TATA binding protein), HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) or ACTB (Beta actin) were used as endogenous controls. The relative quantification of target genes was determined using the  $\Delta\Delta CT$  method. Briefly, the  $C_t$  (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene (GAPDH) ( $CT = C_t \text{ target} - C_t \text{ GAPDH}$ ) and compared with a calibrator :  $\Delta\Delta CT = \Delta C_t \text{ Sample} - \Delta C_t \text{ Calibrator}$ . Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) :  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Statistical analysis.** Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA for non-repeated measures using training and inhibitor as the main effects. Separate analyses were conducted for the SD and HF dietary conditions. Fisher's PLSD post-hoc test was used in the event of a significant ( $P < 0.05$ ) F ratio.

## RESULTS

### EXPERIMENT 1 - STANDARD DIET

Body composition and metabolic characteristics of P and MPTX injections in Tr and Sed rats are presented in Table 2.IV. MPTX injection had no effect on body, intra-abdominal and subcutaneous fat pads weights as well as glucose and energy intake compared to P injections. Body weight was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in Tr rats compared to Sed rats for both P and MPTX injected groups. Insulin as well as HOMA-IR were significantly higher ( $P < 0.01$ ) in the MPTX-Tr group.

#### *Hepatic and plasma TAG*

Liver TAG levels were  $\sim 13$ -16 fold higher in MPTX than in P injected rats in Sed ( $216 \pm 13$  vs  $13.2 \pm 1.8$  mg/g;  $P < 0.01$ ) and Tr ( $188 \pm 9.7$  vs  $13.5 \pm 1.6$  mg/g;  $P < 0.01$ ). (Fig.2.7A). Concomitantly, MPTX injected rats showed significantly lower ( $\sim 80\%$ ;  $P < 0.01$ ) plasma TAG levels in Sed and in Tr rats compared to the P group (Fig.2.7B). No Tr effects on plasma TAG.

#### *AST and ALT*

MPTX inhibition significantly increased ( $P < 0.01$ ) plasma ALT and AST values compared to P rats in the Sed and Tr groups (Fig. 2.7C, 2.7D). Although, ALT values were decreased by  $\sim 37\%$  with training in MPTX group, significance was not achieved (Fig.2.7C). However, training significantly decreased AST levels ( $P < 0.05$ ) in MPTX rats compared to P group (Fig.2.7D).

#### *Hepatic UPR pathway*

Results from qRT-PCR revealed that with the exception of PERK mRNA levels that were lower ( $P < 0.05$ ) with MPTX injection in the Sed group (Fig.2.8C), none of the gene expression of the molecules involved in the UPR were affected by the MPTX or by Tr (Fig.2.8).

## EXPERIMENT 2 - HIGH-FAT DIET

Changes in body composition and metabolic characteristics of P and MTPX injections in Tr and Sed rats fed the HF diet are presented in Table 2.V. Body weight, plasma glucose, insulin and energy intake were unchanged with MTP inhibition or with Tr. MTPX injection resulted in higher ( $P < 0.05$ ) intra-abdominal fat pad weight in Sed and Tr rats, compared to P injected rats. Training decreased ( $P < 0.05$ ) intra-abdominal and subcutaneous fat pad weights in both P and MTPX injected rats.

### *Hepatic and plasma TAG*

MTP inhibition increased liver TAG levels by  $\sim 8$ -9 folds ( $179 \pm 8$  vs  $22 \pm 3$  mg/g;  $P < 0.01$ ) compared to P injected rats in Sed rats (Fig. 2.9A). In addition, exercise training resulted in a further increase of  $\sim 24\%$  ( $P < 0.05$ ) in liver TAG concentration in MTPX injected rats (Fig. 2.9A). In contrast, MTPX injection decreased plasma TAG levels ( $P < 0.01$ ) in Sed and Tr groups, compared to P rats (Fig. 2.9B). No effects of Tr was found in plasma TAG levels (Fig. 2.9B).

### *AST and ALT*

MTPX injection significantly increased ALT ( $\sim 282$  and  $\sim 293\%$ , respectively;  $P < 0.01$ ) and AST ( $\sim 147$  and  $167\%$ , respectively;  $P < 0.01$ ) values compared to P groups irrespective of the training conditions (Fig. 2.9C, D).

### *Hepatic UPR pathway*

MTPX injection resulted in higher ( $P < 0.01$ ) BiP/GRP78, ATF6, PERK and XBP1 mRNA levels, compared to P injected rats, despite Sed or Tr conditions (Fig. 2.10 A, B, C, F). While MTP inhibition increased ( $P < 0.01$ ) EIF2 $\alpha$  gene expression in the Tr group, compared to Sed-MTPX group (Fig. 2.10D). Moreover, training increased ( $P < 0.01$ ) BiP/GRP78 mRNA levels, compared to Sed rats, in P and MTPX groups (Fig. 2.10A).

## DISCUSSION

### Effects of MTP inhibitor

Hepatic VLDL overproduction and their direct metabolic products (*i.e* low density lipoprotein, LDL) could contribute to hypertriglyceridemia observed in obesity (Gormsen 2009) and favor the development of cardiovascular diseases (Packard 2000). Hepatic MTP plays a central regulatory role in VLDL assembly and secretion. Therefore, a class of lipid-lowering drugs has emerged during the last decade which acts by inhibiting MTP activity and therefore decreasing hepatic VLDL synthesis (Wettersau 1998 ; Miyasaki 2007 ; Cuchel 2007). In our experiments, 10 consecutive days of MTP inhibitor injection largely decreased plasma TAG levels ( $\sim 3$  to  $\sim 7$  folds) in both dietary models (Fig. 2.7B and 2.10B). Our results, therefore, strongly support previous findings that are common to MTP inhibitors treatment. MTP inhibitors are expected to be strong antilipemic agents that prevent hepatic TAG secretion and result in lower plasma TAG levels in human ( $\sim 3$  folds) (Cuchel 2007), and in animals ( $\sim 2$  to 6 -folds) (Wettersau 1998 ; Robl 2001 ; Miyazaki 2007). In addition to decreased plasma TAG, MTP inhibition resulted in drastic hepatic fat accumulation in both dietary models (SD and HF diets) (Fig. 2.7A and 2.10A). These observations are in line with previous findings that MTP inhibitor treatment leads to severe liver fat accumulation in human ( $\sim 50\%$  of liver fat content) (Cuchel 2007) and in animals ( $\sim 7$  folds) (Miyasaki 2007). Furthermore, abnormal elevated levels of plasma markers of liver injury such as aminotransaminases (AST and ALT) (Angulo 2002 ; Wang 2006) are usually characteristic of the presence of NAFLD. In our study increased plasma AST ( $\sim 134$  and  $\sim 332\%$ ) and ALT ( $\sim 161$  and  $\sim 304\%$ ) levels (Fig 1B, 4B) were present in rats depicting severe fat accumulation. This is in agreement with Miyasaki et al. (2007) who reported high levels of AST ( $\sim 114\%$ ) and ALT ( $\sim 225\%$ ) in animals treated with T-0126, an MTP inhibitor. On the whole, these results demonstrate

the implication of MTP inhibition in lipid homeostasis perturbations, thus resulting in drastic fat accumulation in the liver.

### **Effects of MTPX on UPR**

Dietary-induced NAFLD has been recently associated with the presence of ER stress in animals (Wang 2006). It is not known if pharmacologically induced liver fat accumulation, such as MTPX, induces hepatic ER stress. Despite drastic liver fat accumulation observed in our SD fed rats, MTPX treatment did not increase the gene expression of molecules involved in the UPR response in these rats (Fig 2.8). These results are in line with findings of Liao et al. (2003), who reported a 7-day MTP inhibition treatment without inducing ER stress in wild-type C57BL/6 mice. Protein concentration of hepatic BiP/GRP78 was unaffected although a 4-fold increase in liver TAG was noticed in these mice. (Liao 2003). On the whole the present results in SD fed animals indicate that the UPR response is not stimulated by large quantity of fat accumulation originating from a decrease in VLDL production.

The most interesting finding of the present study is that MTP inhibition resulted in an increase in gene expression of molecular markers of the UPR (BiP/GRP78, PERK and ATF6) only when rats were fed the HF diet even though liver TAG reached levels comparable to those measured in SD fed rats (~200 mg/g). This indicates that the hepatic UPR and the ER stress are not solely linked to the accumulation of fat but that they are also responsive to the content of the diet. Accordingly, Ozcan et al. (2004) reported increases in BiP/GRP78 mRNA levels and in phosphorylation of PERK in high-fat fed mice and in genetic models of mouse obesity (*ob/ob* mice). It should be noted that a high-fat diet induced obesity leads to an increase in circulating free fatty acids (FFA). In previous studies from our laboratory we observed that plasma FFA levels are increased in rats submitted to the same HF diet as the one used in the present study (Collin et al.,



2006). Therefore, FFAs could possibly act as signal for hepatic ER stress. In fact, Ota et al. (2008) investigated the role of acute and prolonged increased FFA delivery to the liver on development of ER stress. They reported a loss of FFA-stimulated apoB secretion with prolonged lipid overload infusions. This observation was paralleled by increased and/or prolonged hepatic ER stress (Ota 2008). Furthermore, the type of fatty acids reaching the liver could possibly play an important role in the development of ER stress. The presence of increased circulating saturated fatty acids derived from high-saturated fat diet appears to change hepatic lipid and microsomal phospholipids membrane composition. Incorporation of saturated fatty acid into membrane phospholipids can induce a stiffening of the cellular membrane (Spector 1985) and could consequently impair ER functions. In fact, Wang et al. (2006) showed that rats fed a high-saturated fat diet depicted hepatic steatosis characterized by an increased content of saturated fatty acids in liver TAG and in microsomal membrane phospholipids (Wang 2006). BiP/GRP78 mRNA levels and protein content were higher in rats fed the high-saturated fat diet compared to other diets (Wang 2006). The present HF diet, high in saturated fat, may, therefore be an important component of the development of ER stress. On the other hand, the HF diet alone is not enough to induce ER stress since HF fed rats not receiving the MTP blocker did not experience ER stress. Our results would therefore suggest that lipid infiltration resulting from high-saturated fat diet or increased FFA resulting from obesity may render the hepatocytes more susceptible to injury when combined to perturbations such as acute lipid overload resulting from pharmacological inhibition of hepatic VLDL synthesis.

#### **Training effects on UPR**

The present study is the first to investigate the possibility that exercise training may affect UPR in liver. Interestingly, we found that that the gene expression of the protein

chaperon BiP/GRP78 was increased following the 6wk training program in the placebo (~28%) as well as in the MTPX (~39%) rats fed the HF diet (Fig 2.10). In addition, gene expression of XBP-1 was also upregulated in MTPX animals. Similar findings with exercise training have been reported in other tissues including skeletal muscles and brain. Gonzalez et al. (2000), evaluated the effects of a 3 month training program in rat muscles. Their results demonstrated that exercise training induced an increase in the levels of stress protein of the 70-kDa family, including BiP/GRP78. Moreover, BiP/GRP78 protein was significantly increased in the brain of Alzheimer patients following a 16-wk treadmill training program (Um 2008). The only studies related to exercise on UPR in liver were conducted using an acute bout of exercise. In a running rat model, acute exercise activated the synthesis and accumulation of BiP/GRP78 protein in liver cells during an exercise bout (50 min) and the accumulation lasted up to 4h post-exercise (Gonzalez Manso, 2004). In the muscle, a variety of conditions that may be encountered during exercise such as hypoxia (Iwaki et al., 1993; Miller et al., 2002), oxidative (Storz et al., 1990) and mechanical (Knowlton et al., 1991) stress along with glucose deprivation (Welch et al., 1983; Lee, 2001) are known to induce a cellular stress response. Given the essential role played by the liver during exercise (*i.e.* in energy metabolism and protein secretion), it is possible that the increased UPR response following training appears to evolve to protect cells from damage during stress and to maintain cellular homeostasis. Thus, since the liver has the potential to metabolically adapt to chronic exercise, it is conceivable that the UPR response may be part of this adaptation response. It is suggested that exercise training could therefore serve as a potential treatment against hepatic ER stress resulting from pharmacological and/or nutritional interventions. In line with this hypothesis, overexpression of the protein chaperon ORP150 (oxygen related protein 150) in the liver (Nakatani et al., 2005) as well as treatment with a chemical chaperone

(Ozcan et al., 2006) decreased the ER stress response and improved insulin sensitivity in obese mice.

On the whole, the exact mechanisms inducing ER stress in NAFLD and obesity are unclear but likely include alterations in the protein synthesis machinery. Therefore, enhancement of the UPR pathway by exercise training to cope with these alterations provides a unique approach to manage abnormalities associated with NAFLD and obesity.

Tableau 2.III – Oligonucleotide primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction.

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	Accession no
ATF6	GACAAATAGGCCAGCAGAAAACC	TGAGAATTCGAGCCCTGTTC	NM001107196
BiP/GRP78	CCGTAACAATCAAGGTCTACGA	AAGGTGACTTCAATCTGGGGTA	NM013083
eiF2 $\alpha$	CGATAGAGCAGCTGAAAGAGC	TCTTTTGAATTTCTCCAAGTGA	NM001109339
GAPDH	CCCTCTGGAAAGCTGTGG	AGTGGATGCAGGGATGATG	NM017008
IRE1	CCTGAGGAATTACTGGCTTCTC	TCCAGCATCTTGGTGGATG	XM573211
PERK	GATCCGTCTCCCAAACAGG	TAGCCAAGGCTTTGACTTCC	NM031599
XBPI	TGCCCTGGTTACTGAAGAGG	CACCAGCCTTACTCCATTCC	NM001004210

Tableau 2.IV – Body composition and metabolic characteristics measured in sedentary (Sed) and trained (Tr) rats fed a standard diet (SD) and injected with a placebo (P) or MTP inhibitor (MTPX) solution.

	Placebo		MTPX	
	Sed	Tr	Sed	Tr
Body weight (g)	307 $\pm$ 8	333 $\pm$ 7 *	301 $\pm$ 6	320 $\pm$ 13 *
Visceral fat pad (g)	20.5 $\pm$ 2.1	19.2 $\pm$ 2.7	15.4 $\pm$ 1.6	18.6 $\pm$ 3.7
Subcutaneous fat pad (g)	0.33 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.06
Glucose (mM)	7 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 0.5
Insulin (pmol)	438 $\pm$ 70	290 $\pm$ 65	455 $\pm$ 67	650 $\pm$ 54 <sup>‡</sup>
HOMA-IR	19.3 $\pm$ 3.3	15.9 $\pm$ 2.8	22 $\pm$ 3.2	32.6 $\pm$ 4.7 <sup>‡</sup>
Energy intake (kcal/day)	54.2 $\pm$ 7.5	65.9 $\pm$ 65	63.6 $\pm$ 6.6	55.1 $\pm$ 5.4

Values are means  $\pm$  SE ; n = 5-7 rats/group. \* Significantly different from Sed rats,

p < 0.05. <sup>‡</sup> Significantly different from Placebo rats, p < 0.01.

Tableau 2.V – Body composition and metabolic characteristics measured in sedentary (Sed) and trained (Tr) rats fed a high-fat diet (HF) and injected with a placebo (P) or MTP inhibitor (MTPX) solution.

	Placebo		MTPX	
	Sed	Tr	Sed	Tr
Body weight (g)	319±11	320±10	317±12	312±13
Visceral fat pad (g)	28.6±3.7	23.4±3.9 *	23.9±3.6†	13.6±1.5† *
Subcutaneous fat pad (g)	0.63±0.20	0.23±0.04 *	0.34±0.1	0.23±0.02 *
Glucose (mM)	7.8±0.8	8.7±1.5	7.8±0.8	8.1±0.7
Insulin (pmol)	379±76	463±152	446±82	420±76
HOMA-IR	16.7±3	32.9±2.5 *	21.6±3.5	21.4±3.8
Energy intake (kcal/day)	53.2±2.1	53.7±3.9	49.1±5.1	45.5±3.0

Values are means ± SE ; n = 5-7 rats/group. Except for the MTPX-Tr groupe n=2.

\* Significantly different from Sed rats,  $p < 0.05$ . † Significantly different from Placebo rats,  $p < 0.05$ .

### FIGURE LEGENDS

**Fig. 2.7.** (A) Liver and (B) plasma triacylglycerols (TAG) concentrations ; (C) aspartate and (D) alanine transaminases levels in sedentary (Sed) and trained (Tr) injected a MTP inhibitor (MTPX) or a Placebo (P) solution in rats fed a standard (SD) diet. Values are means  $\pm$  SE ; n = 5-6 rats/group. <sup>†</sup> Significantly different from Placebo rats, p <0.01 ; Significantly different from Sed rats, p <0.05.

**Fig. 2.8.** mRNA levels of ER stress molecular markers (A) Bip/GRP78 (B) ATF6 (C) PERK (D) EIF2alpha (E) IRE1alpha (F) XBP1 in sedentary (Sed) and trained (Tr) injected a MTP inhibitor or a placebo solution in rats fed a standard (SD) diet. Values are means  $\pm$  SE ; n = 5-7 rats / group. <sup>†</sup> Significantly different from Placebo rats, p <0.05.

**Fig. 2.9.** (A) Liver and (B) plasma triacylglycerols (TAG) concentrations ; (C) aspartate and (D) alanine transaminases levels in sedentary (Sed) and trained (Tr) injected a MTP inhibitor or a placebo solution in rats fed a high-fat (HF) diet. Values are means  $\pm$  SE ; n = 5-7 rats / group. <sup>†</sup> Significantly different from Placebo rats, p < 0.01 ; \* Significantly different from Sed rats, p <0.05.

**Fig. 2.10.** mRNA levels of ER stress molecular markers (A) Bip/GRP78 (B) ATF6 (C) PERK (D) EIF2alpha (E) IRE1alpha (F) XBP1 in sedentary (Sed) and trained (Tr) injected a MTP inhibitor or a placebo solution in rats fed a high-fat (HF) diet. Values are means  $\pm$  SE ; n = 5-7 rats / group. <sup>†</sup> Significantly different from Placebo rats, p <0.01 ; Significantly different from Sed rats, p <0.05 ; p <0.01.

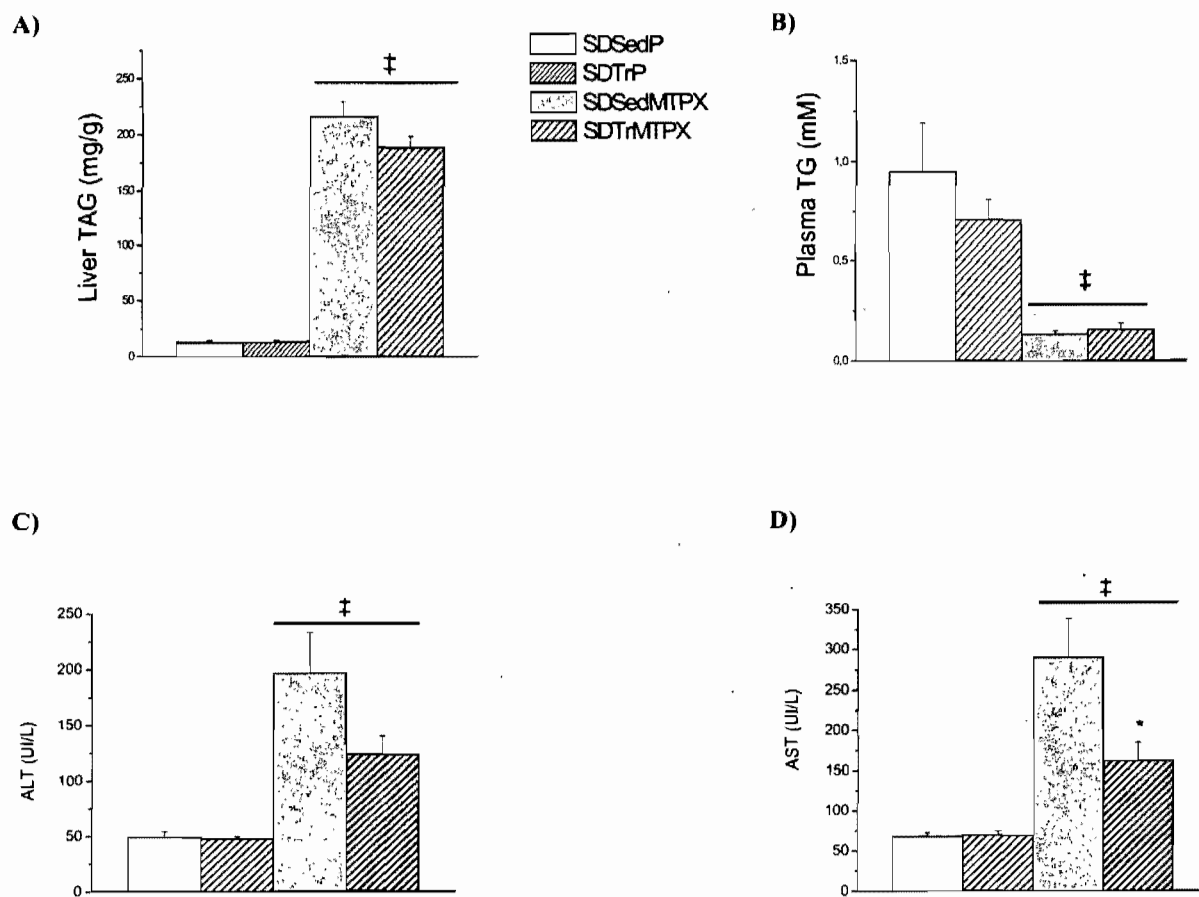


Figure 2.7 –

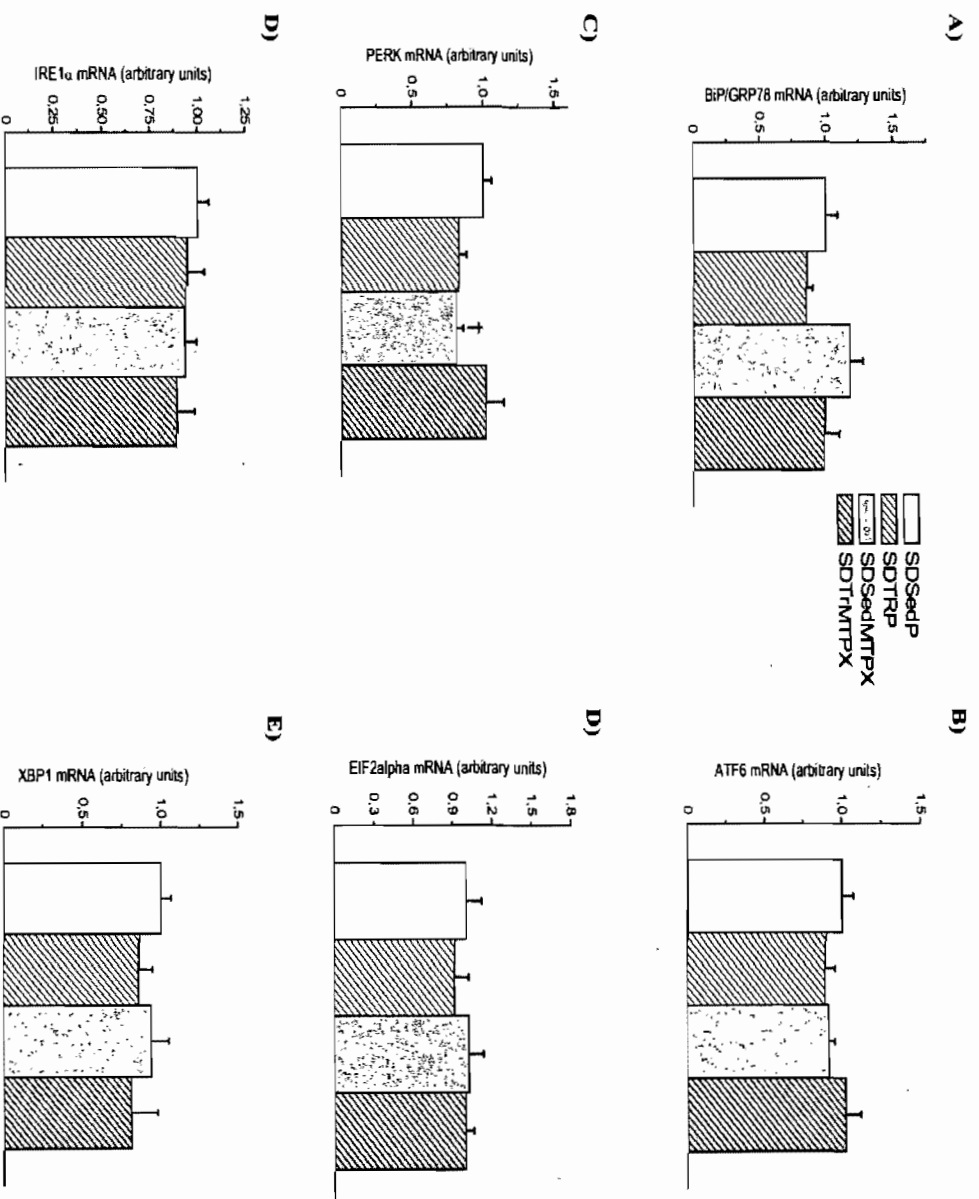


Figure 2.8 –



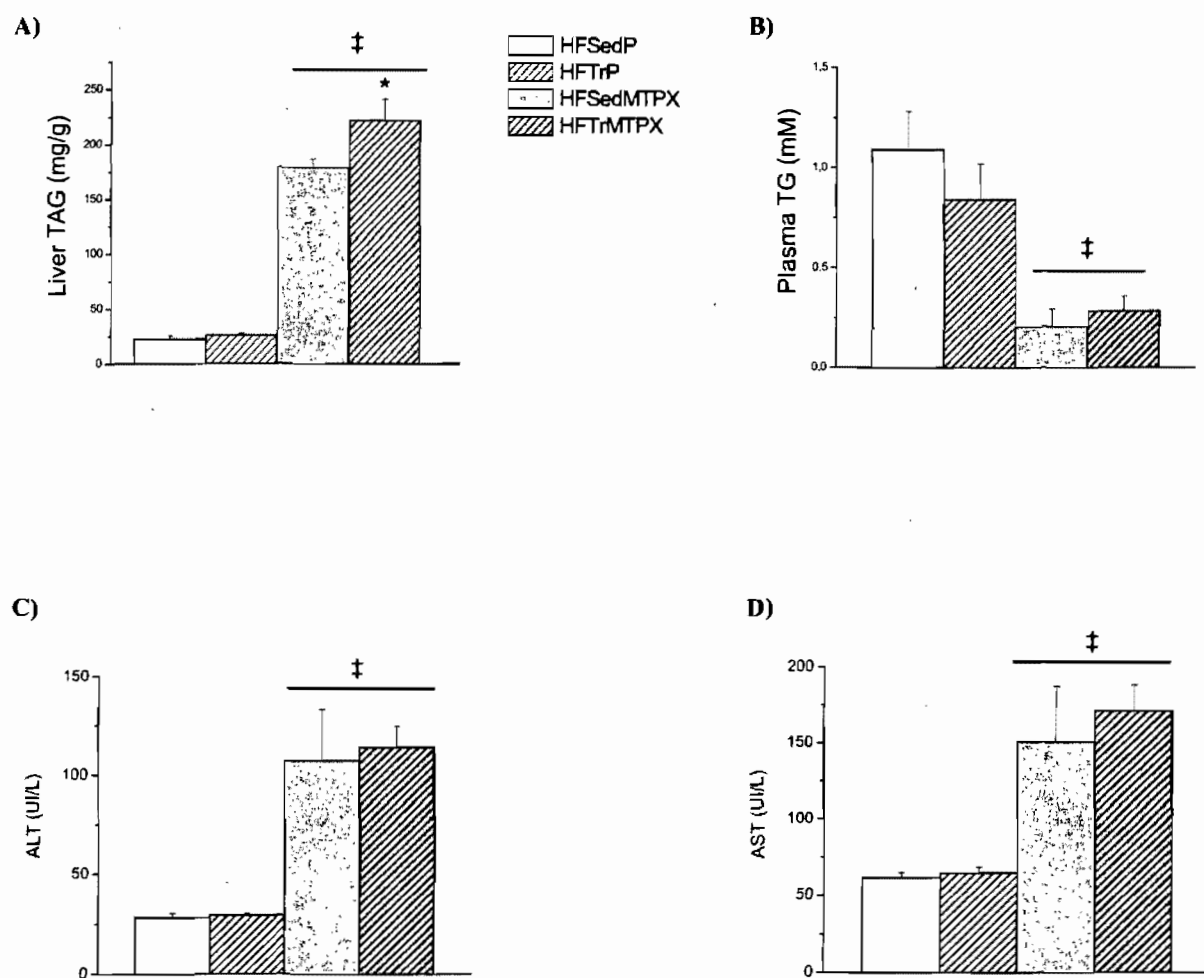


Figure 2.9 –

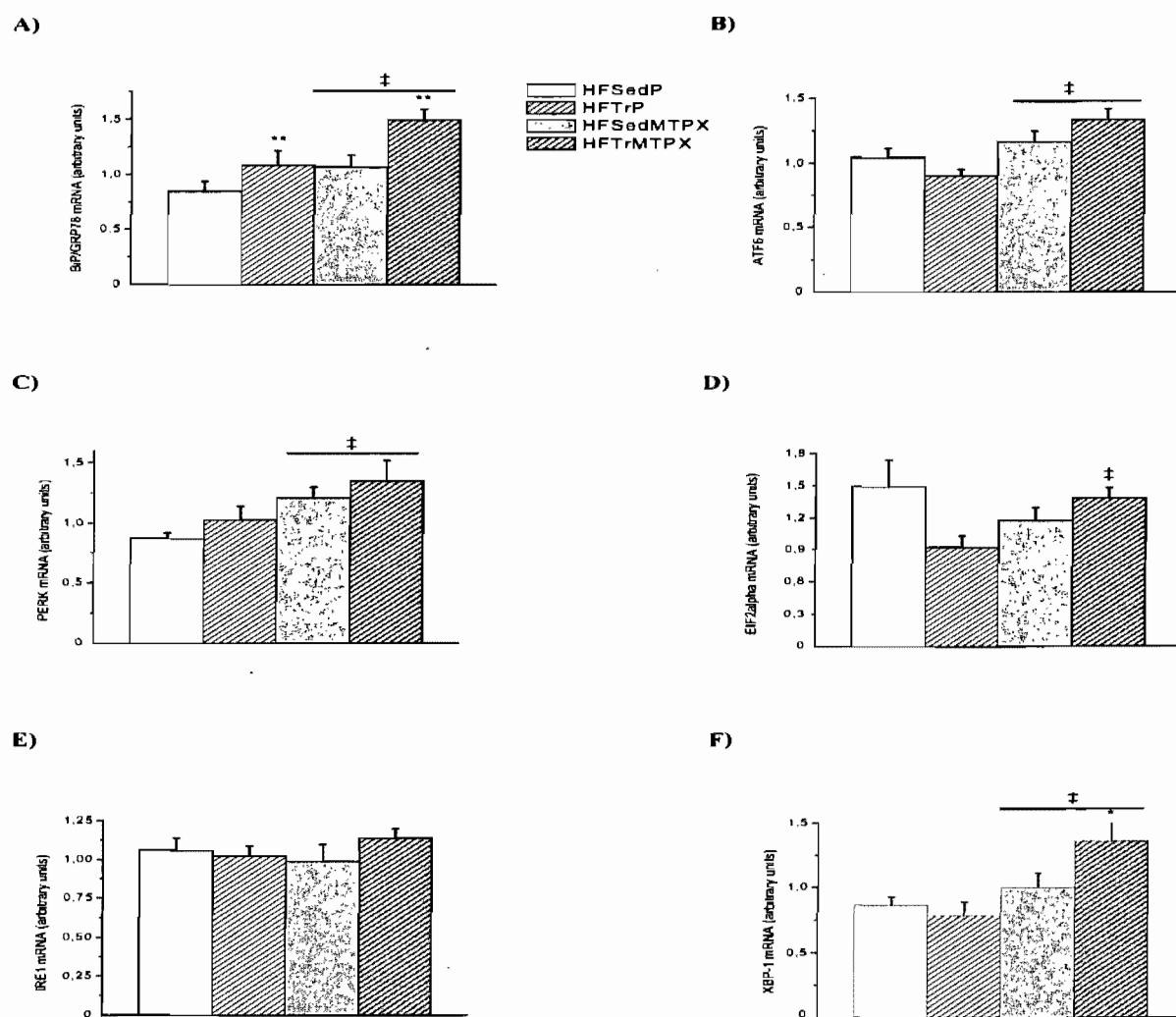


Figure 2.10 –

## REFERENCES

- Angulo P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine* 346, 1221-1231.
- Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P Lavoie JM. (2006). Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr* 96, 268-275.
- Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, Millar JS, Ikewaki K, Siegelman ES, Gregg RE Rader DJ. (2007). Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 356, 148-156.
- Ellgaard L, Molinari M Helenius A. (1999). Setting the standards : quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
- Foufelle F Ferre P. (2007). [Unfolded protein response : its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 23, 291-296.
- Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A Lavoie JM. (2004). Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1064-1071.
- Gauthier MS, Favier R Lavoie JM. (2006). Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 95, 273-281.
- González B, Hernando R Manso R. (2000). Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 440, 42-49.
- Gonzalez B Manso R. (2004). Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise : early and late responses. *J Physiol* 556, 369-385.

Gormsen LC, Nellemann B, Sorensen LP, Jensen MD, Christiansen JS, Nielsen S. (2009). Impact of body composition on very-low-density lipoprotein-triglycerides kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E165-173.

Lavoie J, Gauthier M. (2006). Regulation of fat metabolism in the liver : link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 63, 1393-1409.

Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA. (2003). Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res* 44, 978-985.

Miyazaki, Miwa S, Kodama H, Yamada H, Nagata K, Toriumi W, Kitamura K, Kume E. (2007). Hepatic and intestinal changes in rats treated with T-0126, a microsomal triglyceride transfer protein (mtp) inhibitor. *J Toxicol Sci* 32, 161-177.

Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 118, 316-332.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

Packard C, Caslake M, Shepherd J. (2000). The role of small, dense low density lipoprotein (LDL) : a new look. *International journal of cardiology* 74 Suppl 1, S17-22.

Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 103, 1287-1298.

Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA. (2008). Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G619-626.

Robl JA, Sulsky R, Sun CQ, Simpkins LM, Wang T, Dickson JK, Jr., Chen Y, Magnin DR, Taunk P, Slusarchyk WA, Biller SA, Lan SJ, Connolly F, Kunselman LK, Sabrah T, Jamil H, Gordon D, Harrity TW, Wetterau JR. (2001). A novel series of highly potent benzimidazole-based microsomal triglyceride transfer protein inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 44, 851-856.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. (2004). A trip to the ER : coping with stress. *Trends Cell Biol* 14, 20-28.

Schonfeld G, Lin X, Yue P. (2005). Familial hypobetalipoproteinemia : genetics and metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 62, 1372-1378.

Schröder M, Kaufman RJ. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569, 29-63.

Spector AA, Yorek MA. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26, 1015-1035.

Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, Angulo P. (2005). Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 43, 1060-1066.

Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, Hwang DY, Cho JY. (2008). Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med* 22, 529-539.

Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. (2006). Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. *Endocrinology* 147, 943-951.

Wetterau JR, Gregg RE, Harrity TW, Arbeeny C, Cap M, Connolly F, Chu CH, George RJ, Gordon DA, Jamil H, Jolibois KG, Kunselman LK, Lan SJ, Maccagnan TJ, Ricci B, Yan M, Young D, Chen Y, Fryszman OM, Logan JV, Musial CL, Poss MA, Robl JA, Simpkins LM, Slusarchyk WA, Sulsky R, Taunk P, Magnin DR, Tino JA, Lawrence RM, Dickson JK, Jr. Biller SA. (1998). An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. *Science (New York, NY)* 282, 751-754.

## **CHAPITRE 3**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION**

L'objectif général des trois études conduites dans le cadre de cette thèse était d'évaluer les effets de l'entraînement en endurance sur une voie d'accumulation et une voie d'élimination de lipides au foie, ainsi que sur le stress du RE hépatique associé à la SHNA. Le modèle principalement utilisé afin de réaliser cet objectif fut celui de la SHNA induite par une diète riche en lipides chez le rat.

Il convient d'abord de préciser que les conclusions à tirer de l'ensemble des études de cette thèse sont limitées par le modèle expérimental utilisé. En effet, l'interprétation des résultats obtenus chez le rat doit être faite avec prudence lorsque vient le temps de les transposer à l'humain. À cet égard, le modèle d'induction de la SHNA par une diète riche en lipides n'est peut-être pas représentatif de tous les cas associés à l'obésité.

En ce qui a trait au modèle d'entraînement en endurance utilisé, il aurait été préférable d'imposer une restriction énergétique aux rates sédentaires équivalente à la prise alimentaire des rates entraînées dans l'ensemble des études de la thèse pour éviter l'effet confondant de la perte de poids associée à l'entraînement.

Malgré tout, les informations que nous avons obtenues à l'aide du modèle d'induction de la SHNA par la diète riche en lipides permettent de mieux documenter les mécanismes contributifs au développement de la SHNA et ses conséquences. De plus, les changements observés du profil métabolique ainsi qu'au niveau morphologique typiquement associés à l'entraînement physique sont supportés par d'autres études et confirment ainsi la qualité des interventions que nous avons réalisées [90, 149].

Puisque les principaux thèmes de discussion des études ont été abordés dans les articles présentés au chapitre précédent, la discussion qui suit sera plutôt consacrée à

une synthèse des éléments de discussion individuels. De plus, certaines hypothèses et spéculations basées sur les résultats que nous avons obtenus dans les études de la thèse seront présentées dans ce chapitre. Dans les deux premières études, nous avons étudié les effets de l'entraînement physique sur deux mécanismes contributifs au développement de la SHNA, la lipolyse adipocytaire et la production de VLDL hépatiques.

### **Évaluation du taux de la lipolyse adipocytaire**

Dans la première étude, nous avons établi une cinétique de 0, 2 et 8 semaines des effets de l'entraînement sur tapis roulant sur la lipolyse adipocytaire *in vitro* des tissus adipeux mésentérique et rétropéritonéal chez des rates soumises à une diète riche en lipides.

Tout d'abord, l'utilisation de la méthode *in vitro* permet une mesure régionale de la lipolyse adipocytaire et assure un contrôle maximal des variables intrinsèques (i.e hormones) pouvant perturber la lipolyse adipocytaire [152]. Toutefois, cette approche ne reflète pas strictement la lipolyse globale de l'organisme, et les taux de corrélation observés entre la lipolyse adipocytaire mesurée *in vitro* et la lipolyse adipocytaire évaluée *in vivo* ne concordent pas toujours rigoureusement [167, 221]. Néanmoins, les méthodes de mesure de la lipolyse adipocytaire *in vitro* demeurent utiles et importantes afin d'étudier les mécanismes de la régulation lipolytique.

Puisqu'il est suggéré que l'augmentation de la lipolyse adipocytaire est un mécanisme contributif au développement de la SHNA principalement via l'augmentation des concentrations AGNE plasmatiques, la réduction de la lipolyse adipocytaire par l'entraînement physique devrait théoriquement atténuer l'accumulation de lipides hépatiques. En accord avec cette hypothèse, nous avons constaté que suite à 8 semaines d'entraînement les valeurs de la lipolyse adipocytaire basale et de la lipolyse stimulée, exclusivement dans le tissu adipeux mésentérique, étaient diminuées de  $\sim 55\%$  et se rapprochaient



des valeurs lipolytiques retrouvées après 2 semaines d'entraînement chez des rates soumises à une diète riche en lipides. Selon l'hypothèse de la veine porte, les AGNE issus du tissu adipeux viscéral sont facilement acheminés au foie par la circulation portale dû à la facilité d'accessibilité avec la veine porte. Cette accessibilité expliquerait qu'une diminution de l'activité lipolytique du tissu mésentérique contribue à l'atténuation du développement de la SHNA.

La régulation de la lipolyse adipocytaire est assurée par des paramètres moléculaires ainsi que par des facteurs morphologiques (voir section 1.1.1.2). En ce qui à trait aux paramètres moléculaires, nos résultats montrent que le contenu protéique de la protéine de séquestration, la périlipine, n'a pas été affecté par l'entraînement en endurance chez des rat. Cependant, une mesure des taux de phosphorylation de la PLIN, de même que celle de la LHS aurait permis d'avoir un portrait plus complet de l'effet de l'entraînement sur ces paramètres de régulation de la lipolyse adipocytaire. Il est possible que l'entraînement en endurance résulte en une diminution de l'activité de la PLIN et de la LHS chez des rates soumises à une diète riche en lipides. Cependant aucune étude n'a porté sur l'évaluation de ces paramètres dans un contexte d'obésité et d'entraînement.

En ce qui a trait aux facteurs morphologiques, nous avons constaté que l'adiposité chez les rates entraînés (8 semaines) était inférieure en comparaison aux rates sédentaires nourries avec une diète riche en lipides. À cet égard, nous avons tenté de dissocier l'effet de la diminution de l'adiposité sur la lipolyse adipocytaire en normalisant nos valeurs de lipolyse basale et stimulée du tissu mésentérique par l'adiposité de ce tissu (données non rapportées). Nous avons alors observé que les lipolyses adipocytaires basale et stimulée demeuraient plus basses chez les rates entraînés en comparaison aux rates sédentaires. Ces résultats suggèrent que l'entraînement a un effet sur la lipolyse adipocytaire indépendante de la perte de masse adipeuse engendrée par l'entraînement. Pour confirmer

d'avantage nos observations, il aurait été pertinent d'inclure un groupe de rates nourries avec une diète standard et soumises au programme d'entraînement pour nous permettre de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, malgré l'absence de résultats de la mesure des TAG hépatiques due à des difficultés techniques dans ce projet, cette étude a tout de même confirmée la diminution d'un paramètre contributif à l'accumulation de lipides hépatiques suite à un entraînement physique.

### **Évaluation de la production de VLDL hépatiques**

Dans la continuité du premier projet, nous avons ciblé l'étude d'un mécanisme d'élimination des lipides hépatiques pouvant contribuer au développement de la SHNA, la production de VLDL hépatiques ainsi que l'expression de la protéine-clé de ce processus, la MTP. Les résultats de cette étude ont montré que l'entraînement a diminué la production *in vivo* de VLDL-TAG hépatique de 28% chez les rates soumises à une diète riche en lipides.

L'évaluation du taux de production de VLDL hépatiques dans notre projet s'est réalisée par la mesure des concentrations plasmatiques en TAG sur une période de 90 minutes suite à une infusion de lipides de trois heures. Il faut en premier lieu préciser que l'analyse des concentrations en TAG plasmatiques est considérée comme une estimation de la synthèse et sécrétion de VLDL hépatiques [161, 296]. Puisqu'une seule molécule d'apoB est retrouvée à la surface des VLDL, il aurait été pertinent de procéder à la quantification de l'apo B plasmatique pour ainsi avoir un portrait plus précis de la synthèse et la sécrétion des VLDL hépatiques. Toutefois, les informations que nous avons obtenues à l'aide de l'utilisation de cette approche pour évaluer la production des VLDL hépatiques se sont avérées efficaces et permettent de documenter la production des lipoprotéines hépatiques.

Nos résultats démontrent que les effets de l'entraînement n'ont été seulement observés que chez les rates nourries avec la diète riche en lipides présentant un contenu en TAG hépatiques plus élevés que les rates nourries avec la diète standard. Ces résultats sous-entendent que l'entraînement n'aurait d'effet sur l'élimination des lipides hépatiques que si les concentrations de ceux-ci étaient déjà élevées au foie. À l'appui de cette hypothèse, certaines études ont démontré que l'entraînement n'affectait pas les concentrations hépatiques en TAG chez des rates soumises à une diète standard présentant des niveaux normaux de lipides hépatiques [74, 90].

D'autre part, la diminution de la production de VLDL-TAG hépatiques de 27% était accompagnée d'une diminution de la concentration en TAG hépatiques de 23% chez les rates entraînées nourries avec la diète riche en lipides. Ces observations suggèrent qu'une augmentation de l'oxydation des lipides hépatiques a possiblement eu lieu dans les foies des animaux entraînés. Cette hypothèse est supportée par d'autres résultats qui montrent que la diminution des lipides hépatiques chez des rates obèses suite à un entraînement en endurance est due à l'augmentation de l'oxydation des lipides au foie [213].

Les résultats des études 2 et 3 ont effectivement permis de confirmer que l'entraînement en endurance affecte une voie d'accumulation et une voie d'élimination des lipides hépatiques particulièrement chez les rates nourries avec une diète riche en lipides. De plus, ces résultats montrent que l'entraînement en endurance est un moyen efficace pour l'amélioration du profil lipidique par la diminution de la libération des AGNE issus de la lipolyse adipocytaire et des TAG hépatiques via la production de VLDL.

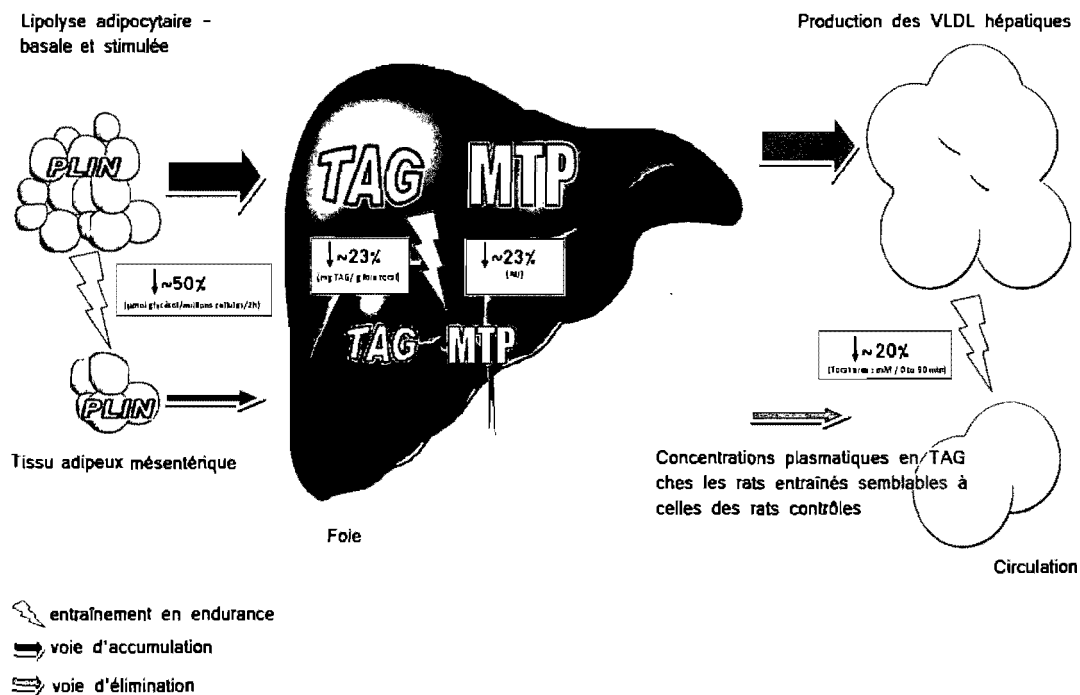


Figure 3.1 – Figure synthèse des projets 1 et 2 chez les rats nourries à la diète riche en lipides. Effets de l'entraînement sur une voie d'accumulation, la lipolyse adipocytaire du tissu mésentérique, et sur une voie d'élimination, la production des VLDL hépatiques, en comparaison aux rats sédentaires (voir Chapitre 2, articles 1 et 2 pour plus d'informations).

### **Le stress du RE hépatique**

Suite à ces résultats et étant donnée les nouvelles évidences expérimentales suggérant que la SHNA puisse engendrer un stress du RE hépatique, nous avons voulu dans notre 3<sup>e</sup> projet étudier les effets d'un entraînement en endurance sur l'expression génétique des paramètres moléculaires de la voie UPR au foie. Les mesures des taux d'ARNm rapportés dans notre projet n'est pas tout à fait représentatif du contenu protéique de chacune de ces protéines, malgré tout l'évaluation des taux d'expression génétique des paramètres moléculaires témoignent de l'activation d'une réponse face à un stimulus.

Dans notre troisième projet, nous avons induit la SHNA par l'administration d'un inhibiteur de l'activité de la MTP hépatique durant dix jours consécutifs chez des rates sédentaires ou entraînées, et nourries avec une diète standard ou riche en lipides pendant six semaines. Cette approche pharmacologique a eu pour effet d'infiltrer sévèrement le foie en lipides, et ce dans un court délai. Ce modèle d'induction de la SHNA par l'inhibition de l'activité de la MTP n'est peut-être pas représentatif des cas de développement de la SHNA associés à l'obésité. Toutefois les informations obtenues à l'aide de ce modèle ont permis de mieux comprendre certaines conséquences moléculaires de la SHNA.

Tel que discuté à la section 1.3, le stress du RE hépatique est une conséquence associée à la SHNA. En réponse à ce stress du RE induit par la SHNA, les cellules ont recours à l'augmentation de la voie UPR afin de rétablir l'homéostasie cellulaire [80, 136, 140, 173, 197, 230]. À cet égard l'augmentation de la réponse UPR par l'entraînement physique devrait théoriquement atténuer le stress du RE hépatique induite par l'accumulation de lipides. Dans cette étude nous avons remarqué que l'entraînement en endurance a augmenté les taux d'expression génétique (ARNm) des marqueurs moléculaires du stress du RE hépatique exclusivement chez les rates soumises à la diète riche en lipides. À l'instar de l'étude 2, cette hypothèse sous-entend que l'entraînement

n'aurait d'effet sur la réponse UPR que lorsque les concentrations des TAG hépatiques élevées retrouvées chez les rats soient en concomitance avec l'ingestion d'une diète riche en lipides. À l'appui de cette hypothèse, une étude conduite chez les patients atteints de la maladie de l'Alzheimer, caractérisée par la l'accumulation des protéines ( $\beta$ -amyloïde) au sein des neurones, montrent que l'entraînement en endurance à eu pour effet d'augmenter le taux de GRP78 [273].

L'induction de l'expression génétique des marqueurs moléculaires du stress du RE rapportée chez les rates injectées à l'inhibiteur nous a amené à supposer que la combinaison d'une diète lipidique et de l'inhibition de la production de VLDL crée un effet synergique sur l'accumulation hépatique de lipides. Cette hypothèse rejoint le modèle de la deuxième atteinte (*second hit model*) proposé par Day et James [54] selon lequel le foie stéatosé devient vulnérable à des agressions contre lesquelles il se défend normalement, ce qui favorise l'évolution de la stéatose vers des formes plus sévères de lésions hépatiques. Dans notre étude, l'administration de la diète riche en lipides aurait constituée la première atteinte et l'inhibiteur de l'activité de la MTP, la deuxième, expliquant l'augmentation de la réponse UPR que nous avons rapportée dans cette condition. Pour confirmer d'avantage cette hypothèse, il aurait été intéressant de mesurer quelques facteurs d'inflammation (C-reactive protein, interleukine-6, etc.)

Il a été démontré que le stress du RE hépatique était associé au développement de l'insulino-résistance par l'activation de la voie IRE1/JNK/IRSsérine [258]. Cette hypothèse est supportée par nos résultats qui montrent que les valeurs du HOMA étaient significativement élevées chez les rates entraînées et traitées à l'inhibiteur de l'activité de la MTP hépatique en comparaison aux rates injectées au placebo. Pour confirmer d'avantage nos observations, il aurait été pertinent de mesurer l'activité de la protéine transmembranaire du RE, l'IRE1, de même que celle du récepteur IRS sur les résidus

sérine ou d'évaluer l'insulino-résistance.

### **Conclusion**

L'ensemble des résultats des études qui composent cette thèse indiquent que la pratique d'exercices physiques entraîne des effets bénéfiques sur le développement de la SHNA par les mécanismes contributifs au développement de cette affection, de même que sur une des conséquences reliées à la SHNA, le stress du RE hépatique.

En effet nous avons montré que l'entraînement réalisé de façon concomitante à une diète riche en lipides a d'une part entraîné des améliorations sur la voie d'accumulation des lipides au foie et d'autre part, sur la voie d'élimination des lipides au foie. Par extension, ces résultats confirment que la pratique d'exercice chez les sujets obèses pourrait d'une part, entraîner des améliorations au niveau extrahépatique comme par exemple la diminution des AGNE circulants et d'autre part, améliorer le profil lipidique chez des sujets présentant une hypertriglycémie associée à l'obésité par la diminution de la production de VLDL hépatiques. À cet égard, nous pouvons postuler que l'entraînement en endurance s'avère efficace dans la prévention du développement de maladies cardiovasculaires puisque les VLDL sont les précurseurs des lipoprotéines athérogènes, les low density lipoprotein (LDL).

Nous avons aussi observé que l'entraînement en endurance peut augmenter la réponse UPR hépatique. De ce fait, l'entraînement semble protéger un foie "vulnérable" aux agressions ultérieures telle une surcharge lipidique. De plus, puisque la réponse UPR semble jouer un rôle déterminant dans la physiopathologie de la SHNA, cette voie pourrait se révéler dans les années futures comme une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement non seulement de la SHNA mais aussi de l'IR et au diabète de type 2.

Toutefois, malgré les évidences expérimentales obtenues à l'aide des résultats des projets expérimentaux complétés au cours de cette thèse, les connaissances sur les méca-

nismes exacts menant au développement de la SHNA et des ses conséquences demeurent incertaines. Par ceci, il serait souhaitable que les résultats issus des projets expérimentaux de cette thèse puissent inciter les recherches à poursuivre dans cette voie. Ainsi, les modèles expérimentaux utilisés au cours des projets expérimentaux qui composent cette thèse pourront s'avérer utiles dans le développement de design de projets futurs portant sur l'évaluation des mécanismes impliqués dans le métabolisme des lipides au sein de modèles présentant divers degrés de lésions hépatiques, soumis à différents types de programme d'entraînement, ou autres modèles présentant une pathologie.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. Aarsland et R. R. Wolfe. Hepatic secretion of vldl fatty acids during stimulated lipogenesis in men. *J Lipid Res*, 39(6):1280–1286, Jun 1998.
- [2] R. S. Ahima et J. S. Flier. Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62:413–437, 2000.
- [3] F Akbiyik, K Cinar, E Demirpence, T Ozsullu, R Tunca, R Hazirolu, C Yurdaydin, O Uzunalimoglu et H Bozkaya. Ligand-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest*, 34(6):429–435, Jun 2004.
- [4] S Alam, M Stolinski, C Pentecost, M A Boroujerdi, R H Jones, P H Sonksen et A M Umpleby. The effect of a six-month exercise program on very low-density lipoprotein apolipoprotein b secretion in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(2):688–694, Feb 2004.
- [5] C A Alexander, R L Hamilton et R J Havel. Subcellular localization of b apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. *J Cell Biol*, 69(2):241–263, May 1976.
- [6] F Angelico, M Del Ben, R Conti, S Francioso, K Feole, D Maccioni, T M Antonini et C Alessandri. Non-alcoholic fatty liver syndrome : a hepatic consequence of common metabolic diseases. *J Gastroenterol Hepatol*, 18(5):588–594, May 2003.
- [7] P Angulo. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346(16):1221–1231, Apr 2002.
- [8] T Aoyama, J M Peters, N Iritani, T Nakajima, K Furihata, T Hashimoto et F J Gonzalez. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in

- mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (pparalpha). *J Biol Chem*, 273(10):5678–5684, Mar 1998.
- [9] P Arner. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. *Diabetes Metab Rev*, 4(5):507–515, Aug 1988.
- [10] P Arner. The adipocyte in insulin resistance : key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*, 14(3):137–145, Apr 2003.
- [11] P Arner. Human fat cell lipolysis : biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19(4):471–482, Dec 2005.
- [12] P Arner, L Hellström, H Wahrenberg et M Brönnegård. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J Clin Invest*, 86(5):1595–1600, Nov 1990.
- [13] P Arner, E Kriegholm, P Engfeldt et J Bolinder. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest*, 85(3):893–898, Mar 1990.
- [14] P Arner et D Langin. The role of neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Lipidol*, 18(3):246–250, Jun 2007.
- [15] E W Askew et A L Hecker. Adipose tissue cell size and lipolysis in the rat : response to exercise intensity and food restriction. *J Nutr*, 106(9):1351–1360, Sep 1976.
- [16] E W Askew, R L Huston, C G Plopper et A L Hecker. Adipose tissue cellularity and lipolysis. response to exercise and cortisol treatment. *J Clin Invest*, 56(3): 521–529, Sep 1975.

- [17] L Asp, C Claesson, J Boren et S O Olofsson. Adp-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase d are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 275(34):26285–26292, Aug 2000.
- [18] B R Barrows et E J Parks. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(4):1446–1452, Apr 2006.
- [19] E D Bartels, M Lauritsen et L B Nielsen. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes*, 51(4):1233–1239, Apr 2002.
- [20] P Belfrage, G Fredrikson, H Olsson et P Strålfors. Hormonal regulation of adipose tissue lipolysis by reversible phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Prog Clin Biol Res*, 102 Pt C:213–223, 1982.
- [21] P Belfrage, B Jergil, P Strålfors et H Tornqvist. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue : identification and some properties of the enzyme protein. *FEBS Lett*, 75(1):259–264, Mar 1977.
- [22] A J Bennett, M A Billett, A M Salter et D A White. Regulation of hamster hepatic microsomal triglyceride transfer protein mrna levels by dietary fats. *Biochem Biophys Res Commun*, 212(2):473–478, Jul 1995.
- [23] B L Bennett, D T Sasaki, B W Murray, E C O’Leary, S T Sakata, W Xu, J C Leisten, A Motiwala, S Pierce, Y Satoh, S S Bhagwat, A M Manning et D W Anderson. Sp600125, an anthrapyrazolone inhibitor of jun n-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24):13681–13686, Nov 2001.

- [24] J J Berger et R J Barnard. Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol*, 87(1):227–232, Jul 1999.
- [25] M Blüher, L Wilson-Fritch, J Leszyk, P G Laustsen, S Corvera et C R Kahn. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J Biol Chem*, 279(30):31902–31909, Jul 2004.
- [26] N M Borradaile, X Han, J D Harp, S E Gale, D S Ory et J E Schaffer. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res*, 47(12):2726–2737, Dec 2006.
- [27] P. Bougnères, C. L. Stunff, C. Pecqueur, E. Pinglier, P. Adnot et D. Ricquier. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. a new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest*, 99(11):2568–2573, Jun 1997.
- [28] L J Brady, P S Brady, D R Romsos et C L Hoppel. Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. *Biochem J*, 231(2):439–444, Oct 1985.
- [29] D L Brasaemle. Thematic review series : adipocyte biology. the perilipin family of structural lipid droplet proteins : stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*, 48(12):2547–2559, Dec 2007.
- [30] D. L. Brasaemle, T. Barber, N. E. Wolins, G. Serrero, E. J. Blanchette-Mackie et C. Londos. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*, 38(11):2249–2263, Nov 1997.
- [31] D L Brasaemle, G Dolios, L Shapiro et R Wang. Proteomic analysis of proteins

associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 279(45):46835–46842, Nov 2004.

- [32] D L Brasaemle, B Rubin, I A Harten, J Gruia-Gray, A R Kimmel et C Londos. Perilipin a increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, 275(49):38486–38493, Dec 2000.
- [33] A M Brown et G F Gibbons. Insulin inhibits the maturation phase of vldl assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(10):1656–1661, Oct 2001.
- [34] M. S. Brown et J. L. Goldstein. The srebp pathway : regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3): 331–340, May 1997.
- [35] J D Browning et J D Horton. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114(2):147–152, Jul 2004.
- [36] L Bukowiecki, J Lupien, N Follea, A Paradis, D Richard et J LeBlanc. Mechanism of enhanced lipolysis in adipose tissue of exercise-trained rats. *Am J Physiol*, 239(6):422–429, Dec 1980.
- [37] D Cai, M Yuan, D F Frantz, P A Melendez, L Hansen, J Lee et S E Shoelson. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of ikk-beta and nf-kappab. *Nat Med*, 11(2):183–190, Feb 2005.
- [38] González-Yanes Carmen et Sánchez-Margalet Víctor. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*, 18(4):401–408, Apr 2006.
- [39] A Carpentier, C Taghibiglou, N Leung, L Szeto, S C Van Iderstine, K D Uffelman, R Buckingham, K Adeli et G F Lewis. Ameliorated hepatic insulin resistance is

associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem*, 277(32):28795–28802, Aug 2002.

- [40] S Cases, S J Stone, P Zhou, E Yen, B Tow, K D Lardizabal, T Voelker et R V Farese. Cloning of dgat2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*, 276(42):38870–38876, Oct 2001.
- [41] N Chalasani, J C Gorski, M S Asghar, A Asghar, B Foresman, S D Hall et D W Crabb. Hepatic cytochrome p450 2e1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37(3):544–550, Mar 2003.
- [42] Michael Charlton, Raghavakaimal Sreekumar, Deborah Rasmussen, Keith Lindor et K. Sreekumaran Nair. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 35(4):898–904, Apr 2002.
- [43] M Cifuentes, C Albala et C V Rojas. Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res*, 41(2):197–204, 2008.
- [44] J M Clark, F L Brancati et A M Diehl. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122(6):1649–1657, May 2002.
- [45] Jeanne M Clark. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol*, 40 Suppl 1:S5–10, Mar 2006.
- [46] P Collin, N Chapados, E Dufresne, P Corriveau, P Imbeault et J M Lavoie. Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr*, 96(2):268–275, Aug 2006.

- [47] R. V. Considine, M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee et T. L. Bauer. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334(5):292–295, Feb 1996.
- [48] S W Coppack, M D Jensen et J M Miles. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res*, 35(2):177–193, Feb 1994.
- [49] W. Y. Craig et A. D. Cooper. Effects of chylomicron remnants and beta-vldl on the class and composition of newly secreted lipoproteins by hepg2 cells. *J Lipid Res*, 29(3):299–308, Mar 1988.
- [50] F Crampes, M Beauville, D Riviere et M Garrigues. Effect of physical training in humans on the response of isolated fat cells to epinephrine. *J Appl Physiol*, 61(1):25–29, Jul 1986.
- [51] F Crampes, M Beauville, D Riviere, M Garrigues et M Lafontan. Lack of desensitization of catecholamine-induced lipolysis in fat cells from trained and sedentary women after physical exercise. *J Clin Endocrinol Metab*, 67(5):1011–1017, Nov 1988.
- [52] F Crampes, D Riviere, M Beauville, M Marceron et M Garrigues. Lipolytic response of adipocytes to epinephrine in sedentary and exercise-trained subjects : sex-related differences. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 59(4):249–255, 1989.
- [53] M Cuchel, L T Bloedon, P O Szapary, D M Kolansky, M L Wolfe, A Sarkis, J S Millar, K Ikewaki, E S Siegelman, R E Gregg et D J Rader. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 356(2):148–156, Jan 2007.

- [54] C P Day et O F James. Steatohepatitis : a tale of two "hits" ? *Gastroenterology*, 114(4):842–845, Apr 1998.
- [55] I De Glisezinski, F Crampes, I Harant, M Berlan, J Hejnova, D Langin, D Rivière et V Stich. Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol*, 275(6 Pt 1):951–956, Dec 1998.
- [56] M Delépine, M Nicolino, T Barrett, M Golamaully, G M Lathrop et C Julier. Eif2ak3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with wolcott-rallison syndrome. *Nat Genet*, 25(4):406–409, Aug 2000.
- [57] R Dentin, F Benhamed, I Hainault, V Fauveau, F Foufelle, J R Dyck, J Girard et C Postic. Liver-specific inhibition of chrebp improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, 55(8):2159–2170, Aug 2006.
- [58] Renaud Dentin, Jean Girard et Catherine Postic. Carbohydrate responsive element binding protein (chrebp) and sterol regulatory element binding protein-1c (srebp-1c) : two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1):81–86, Jan 2005.
- [59] J P Despres, C Bouchard, R Savard, D Prud'homme, L Bukowiecki et G Theriault. Adaptive changes to training in adipose tissue lipolysis are genotype dependent. *Int J Obes*, 8(1):87–95, 1984.
- [60] J P Després, C Bouchard, R Savard, A Tremblay et C Allard. Lack of relationship between changes in adiposity and plasma lipids following endurance training. *Atherosclerosis*, 54(2):135–143, Feb 1985.
- [61] J P Després, C Bouchard, R Savard, A Tremblay, M Marcotte et G Thériault. The



effect of a 20-week endurance training program on adipose-tissue morphology and lipolysis in men and women. *Metabolism*, 33(3):235–239, Mar 1984.

- [62] J P Després, C Bouchard, R Savard, A Tremblay, M Marcotte et G Thériault. Effects of exercise-training and detraining on fat cell lipolysis in men and women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 53(1):25–30, 1984.
- [63] J P Després, C Bouchard, R Savard, A Tremblay, M Marcotte et G Thériault. Level of physical fitness and adipocyte lipolysis in humans. *J Appl Physiol*, 56(5):1157–1161, May 1984.
- [64] F. Diraison et M. Beylot. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in ffa reesterification. *Am J Physiol*, 274(2 Pt 1): E321–E327, Feb 1998.
- [65] F. Diraison, Ph Moulin et M. Beylot. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29(5):478–485, Nov 2003.
- [66] Frédérique Diraison, Eric Dusserre, Hubert Vidal, Monique Sothier et Michel Beylot. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282(1):E46–E51, Jan 2002.
- [67] K L Donnelly, C I Smith, S J Schwarzenberg, J Jessurun, M D Boldt et E J Parks. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5):1343–1351, May 2005.

- [68] V R Drel, N Mashtalir, O Ilnytska, J Shin, F Li, V V Lyzogubov et I G Obrosova. The leptin-deficient (ob/ob) mouse : a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 55(12):3335–3343, Dec 2006.
- [69] R E Duncan, M Ahmadian, K Jaworski, E Sarkadi-Nagy et H S Sul. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*, 27:79–101, 2007.
- [70] M Duvnjak, I LerotiÄĖ, N BarsiÄĖ, V TomasiÄĖ, L ViroviÄĖ JukiÄĖ et V VelagiÄĖ. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 13(34):4539–4550, Sep 2007.
- [71] L Ellgaard et A Helenius. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(3):181–191, Mar 2003.
- [72] L H Enevoldsen, B Stallknecht, J D Fluckey et H Galbo. Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(3):585–592, Sep 2000.
- [73] L H Enevoldsen, B Stallknecht, J Langfort, L N Petersen, C Holm, T Ploug et H Galbo. The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. *J Physiol*, 536(Pt 3):871–877, Nov 2001.
- [74] D Estadella, L M Oyama, A R Dâmaso, E B Ribeiro et C M Oller Do Nascimento. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20(2):218–224, Feb 2004.
- [75] E Fabbrini, B S Mohammed, F Magkos, K M Korenblat, B W Patterson et S Klein. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2):424–431, Feb 2008.

- [76] I. Sadaf Farooqi, Giuseppe Matarese, Graham M Lord, Julia M Keogh, Elizabeth Lawrence, Chizo Agwu, Veronica Sanna, Susan A Jebb, Francesco Perna, Silvia Fontana, Robert I Lechler, Alex M DePaoli et Stephen O'Rahilly. Beneficial effects of leptin on obesity, t cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, 110(8):1093–1103, Oct 2002.
- [77] Fabien Forcheron, Ana Cachefo, Sylvie Thevenon, Claudie Pinteaur et Michel Beylot. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 51(12):3486–3491, Dec 2002.
- [78] M. Foretz, C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Lièvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferré et F. Foufelle. Add1/srebp-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, 19(5):3760–3768, May 1999.
- [79] X Formiguera et A Cantón. Obesity : epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18(6):1125–1146, Dec 2004.
- [80] F Foufelle et P Ferré. [unfolded protein response : its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*, 23(3):291–296, Mar 2007.
- [81] O L Francone, G Griffaton et A D Kalopissis. Effect of a high-fat diet on the incorporation of stored triacylglycerol into hepatic vldl. *Am J Physiol*, 263(4 Pt 1):615–623, Oct 1992.
- [82] G Fredrikson, P Strålfors, N O Nilsson et P Belfrage. Hormone-sensitive lipase

of rat adipose tissue. purification and some properties. *J Biol Chem*, 256(12): 6311–6320, Jun 1981.

- [83] G Fredrikson, H Tornqvist et P Belfrage. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*, 876(2):288–293, Apr 1986.
- [84] G Frühbeck, M Aguado, J Gómez-Ambrosi et J A Martínez. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 250(1):99–102, Sep 1998.
- [85] G Frühbeck, M Aguado et J A Martínez. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes : evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, 240(3):590–594, Nov 1997.
- [86] R Gambino, M Cassader, G Pagano, M Durazzo et G Musso. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein : a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in nash ? *Hepatology*, 45(5):1097–1107, May 2007.
- [87] R. Garlatti, M. et Barouki. Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *MEDECINE/SCIENCES*, 18:585–94, 2002.
- [88] G. Gasbarrini, V. Vero, L. Miele, A. Forgione, A. P. Hernandez, A. V. Greco, A. Gasbarrini et A. Grieco. Nonalcoholic fatty liver disease : defining a common problem. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 9(5):253–259, 2005.
- [89] M S Gauthier, K Couturier, A Charbonneau et J M Lavoie. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic stea-

tosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28(8):1064–1071, Aug 2004.

- [90] M S Gauthier, K Couturier, J G Latour et J M Lavoie. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*, 94(6):2127–2134, Jun 2003.
- [91] M S Gauthier, R Favier et J M Lavoie. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr*, 95(2):273–281, Feb 2006.
- [92] L Ghibaudi, J Cook, C Farley, M van Heek et J J Hwa. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*, 10(9):956–963, Sep 2002.
- [93] G. F. Gibbons et F. J. Burnham. Effect of nutritional state on the utilization of fatty acids for hepatitic triacylglycerol synthesis and secretion as very-low-density lipoprotein. *Biochem J*, 275 ( Pt 1):87–92, Apr 1991.
- [94] G F Gibbons, K Islam et R J Pease. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*, 1483(1):37–57, Jan 2000.
- [95] G F Gibbons, D Wiggins, A M Brown et A M Hebbachi. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 1):59–64, Feb 2004.
- [96] H N Ginsberg. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol ? *Cell Metab*, 4(3):179–181, Sep 2006.

- [97] H N Ginsberg, Y L Zhang et A Hernandez-Ono. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*, 36(3):232–240, May-Jun 2005.
- [98] J. Girard, D. Perdereau, F. Foufelle, C. Prip-Buus et P. Ferré. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J*, 8(1):36–42, Jan 1994.
- [99] B González et R Manso. Induction, modification and accumulation of hsp70s in the rat liver after acute exercise : early and late responses. *J Physiol*, 556(Pt 2): 369–385, Apr 2004.
- [100] D A Gordon. Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein b lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol*, 8(3):131–137, Jun 1997.
- [101] D A Gordon et H Jamil. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-b lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1486(1):72–83, Jun 2000.
- [102] D A Gordon, J R Wetterau et R E Gregg. Microsomal triglyceride transfer protein : a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends Cell Biol*, 5(8):317–321, Aug 1995.
- [103] J G Granneman et H P Moore. Location, location : protein trafficking and lipolysis in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 19(1):3–9, Jan 2008.
- [104] A S Greenberg, J J Egan, S A Wek, N B Garty, E J Blanchette-Mackie et C Londos. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein

associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*, 266(17): 11341–11346, Jun 1991.

- [105] A S Greenberg, J J Egan, S A Wek, M C Moos, C Londos et A R Kimmel. Isolation of cdnas for perilipins a and b : sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):12035–12039, Dec 1993.
- [106] V Greenfield, O Cheung et A J Sanyal. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 24(3):320–327, May 2008.
- [107] G Haemmerle, R Zimmermann, M Hayn, C Theussl, G Waeg, E Wagner, W Sattler, T M Magin, E F Wagner et R Zechner. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 277(7):4806–4815, Feb 2002.
- [108] D L Hagan, B Kienzle, H Jamil et N Hariharan. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem*, 269(46):28737–28744, Nov 1994.
- [109] P. E. Hall, S. R. Smith, D. B. Jack et M. J. Kendall. The influence of beta-adrenoceptor blockade on the lipolytic response to exercise. *J Clin Pharm Ther*, 12(2):101–106, Apr 1987.
- [110] H P Harding, M Calton, F Urano, I Novoa et D Ron. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18:575–599, 2002.

- [111] H P Harding, H Zeng, Y Zhang, R Jungries, P Chung, H Plesken, D D Sabatini et D Ron. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*, 7(6): 1153–1163, Jun 2001.
- [112] H P Harding, Y Zhang, A Bertolotti, H Zeng et D Ron. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 5(5):897–904, May 2000.
- [113] H P Harding, Y Zhang et D Ron. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716):271–274, Jan 1999.
- [114] A E Hardman, J E Lawrence et S L Herd. Postprandial lipemia in endurance-trained people during a short interruption to training. *J Appl Physiol*, 84(6):1895–1901, Jun 1998.
- [115] T Hashimoto, W S Cook, C Qi, A V Yeldandi, J K Reddy et M S Rao. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem*, 275(37):28918–28928, Sep 2000.
- [116] W L Haskell, I M Lee, R R Pate, K E Powell, S N Blair, B A Franklin, C A Macera, G W Heath, P D Thompson, A Bauman, American College of Sports Medicine et American Heart Association. Physical activity and public health : updated recommendation for adults from the american college of sports medicine and the american heart association. *Circulation*, 116(9):1081–1093, Aug 2007.
- [117] K Haze, T Okada, H Yoshida, H Yanagi, T Yura, M Negishi et K Mori. Identification of the g13 (camp-response-element-binding protein-related protein) gene



product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*, 355(Pt 1):19–28, Apr 2001.

- [118] R B Heath, F Karpe, R W Milne, G C Burdge, S A Wootton et K N Frayn. Dietary fatty acids make a rapid and substantial contribution to vldl-triacylglycerol in the fed state. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(3):732–739, Mar 2007.
- [119] R. Hertz, J. Magenheimer, I. Berman et J. Bar-Tana. Fatty acyl-coa thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature*, 392(6675):512–516, Apr 1998.
- [120] A. L. Hevener, D. Reichart et J. Olefsky. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes*, 49(12):2154–2159, Dec 2000.
- [121] R. C. Hickner, S. B. Racette, E. F. Binder, J. S. Fisher et W. M. Kohrt. Effects of 10 days of endurance exercise training on the suppression of whole body and regional lipolysis by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(4):1498–1504, Apr 2000.
- [122] J Hirosumi, G Tuncman, L Chang, C Z Görgün, K T Uysal, K Maeda, M Karin et G S Hotamisligil. A central role for jnk in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913):333–336, Nov 2002.
- [123] L Hodson, A S Bickerton, S E McQuaid, R Roberts, F Karpe, K N Frayn et B A Fielding. The contribution of splanchnic fat to vldl triglyceride is greater in insulin-resistant than insulin-sensitive men and women : studies in the post-prandial state. *Diabetes*, 56(10):2433–2441, Oct 2007.

- [124] C Holm. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6):1120–1124, Dec 2003.
- [125] J F Horowitz. Regulation of lipid mobilization and oxidation during exercise in obesity. *Exerc Sport Sci Rev*, 29(1):42–46, 2001.
- [126] J F Horowitz. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab*, 14(8):386–392, Oct 2003.
- [127] J F Horowitz, R J Braudy, W H Martin et S Klein. Endurance exercise training does not alter lipolytic or adipose tissue blood flow sensitivity to epinephrine. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 1):325–331, Aug 1999.
- [128] J. D. Horton, Y. Bashmakov, I. Shimomura et H. Shimano. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):5987–5992, May 1998.
- [129] B V Howard. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*, 28(6):613–628, Jun 1987.
- [130] S. D. Hsieh et H. Yoshinaga. Abdominal fat distribution and coronary heart disease risk factors in men-waist/height ratio as a simple and useful predictor. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19(8):585–589, Aug 1995.
- [131] M M Hussain, P Rava, X Pan, K Dai, S K Dougan, J Iqbal, F Lazare et I Khatun. Microsomal triglyceride transfer protein in plasma and cellular lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 19(3):277–284, Jun 2008.
- [132] T Izawa et T Komabayashi.  $\text{Ca}^{2+}$  and lipolysis in adipocytes from exercise-trained rats. *J Appl Physiol*, 77(6):2618–2624, Dec 1994.

- [133] M D Jensen. Fate of fatty acids at rest and during exercise : regulatory mechanisms. *Acta Physiol Scand*, 178(4):385–390, Aug 2003.
- [134] M. D. Jensen, M. W. Haymond, R. A. Rizza, P. E. Cryer et J. M. Miles. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest*, 83(4):1168–1173, Apr 1989.
- [135] C Ji. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 1:16–24, Mar 2008.
- [136] C Ji et N Kaplowitz. Er stress : can the liver cope ? *J Hepatol*, 45(2):321–333, Aug 2006.
- [137] J A Johnson, S K Fried, F X Pi-Sunyer et J B Albu. Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(1):40–49, Jan 2001.
- [138] T Katayama, K Imaizumi, T Manabe, J Hitomi, T Kudo et M Tohyama. Induction of neuronal death by er stress in alzheimer’s disease. *J Chem Neuroanat*, 28(1-2): 67–78, Sep 2004.
- [139] R J Kaufman. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 13(10):1211–1233, May 1999.
- [140] R J Kaufman. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110(10):1389–1398, Nov 2002.
- [141] Erin E Kershaw et Jeffrey S Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2548–2556, Jun 2004.

- [142] S Kersten. Effects of fatty acids on gene expression : role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, liver x receptor alpha and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Nutr Soc*, 61(3):371–374, Aug 2002.
- [143] C. H. Kim, J. H. Youn, J. Y. Park, S. K. Hong, K. S. Park, S. W. Park, K. I. Suh et K. U. Lee. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278(6):E977–E984, Jun 2000.
- [144] J. B. Kim, P. Sarraf, M. Wright, K. M. Yao, E. Mueller, G. Solanes, B. B. Lowell et B. M. Spiegelman. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through add1/srebp1. *J Clin Invest*, 101(1):1–9, Jan 1998.
- [145] S Klein, E F Coyle et R R Wolfe. Effect of exercise on lipolytic sensitivity in endurance-trained athletes. *J Appl Physiol*, 78(6):2201–2206, Jun 1995.
- [146] S Klein, J M Weber, E F Coyle et R R Wolfe. Effect of endurance training on glycerol kinetics during strenuous exercise in humans. *Metabolism*, 45(3):357–361, Mar 1996.
- [147] S Klein, V R Young, G L Blackburn, B R Bistrian et R R Wolfe. Palmitate and glycerol kinetics during brief starvation in normal weight young adult and elderly subjects. *J Clin Invest*, 78(4):928–933, Oct 1986.
- [148] M Kohjima, M Enjoji, N Higuchi, M Kato, K Kotoh, T Yoshimoto, T Fujino, M Yada, R Yada, N Harada, R Takayanagi et M Nakamuta. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 20(3):351–358, Sep 2007.

- [149] E W Kraegen, D E James, A B Jenkins, D J Chisholm et L H Storlien. A potent in vivo effect of ciglitazone on muscle insulin resistance induced by high fat feeding of rats. *Metabolism*, 38(11):1089–1093, Nov 1989.
- [150] W E Kraus, J A Houmard, B D Duscha, K J Knetzger, M B Wharton, J S McCartney, C W Bales, S Henes, G P Samsa, J D Otvos, K R Kulkarni et C A Slentz. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*, 347(19):1483–1492, Nov 2002.
- [151] M Lafontan, C Moro, C Sengenès, J Galitzky, F Crampes et M Berlan. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides : the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(10):2032–2042, Oct 2005.
- [152] K H Lange. Fat metabolism in exercise—with special reference to training and growth hormone administration. *Scand J Med Sci Sports*, 14(2):74–99, Apr 2004.
- [153] D Langin. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol*, 329(8):598–607, Aug 2006.
- [154] Dominique Langin. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 53(6):482–491, Jun 2006.
- [155] V Large et P Arner. Regulation of lipolysis in humans. pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab*, 24(5):409–418, Nov 1998.
- [156] V Large, S Reynisdottir, D Langin, K Fredby, M Klannemark, C Holm et P Arner. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in

subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res*, 40(11):2059–2066, Nov 1999.

- [157] Claire Z Larter et Geoffrey C Farrell. Insulin resistance, adiponectin, cytokines in nash : Which is the best target to treat ? *J Hepatol*, 44(2):253–261, Feb 2006.
- [158] J. M. Lavoie, J. Bongbélé, S. Cardin, M. Bélisle, J. Terrettaz et G. Van de Werve. Increased insulin suppression of plasma free fatty acid concentration in exercise-trained rats. *J Appl Physiol*, 74(1):293–296, Jan 1993.
- [159] J M Lavoie et M S Gauthier. Regulation of fat metabolism in the liver : link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci*, 63(12):1393–1409, Jun 2006.
- [160] A S Lee, A M Delegeane, V Baker et P C Chow. Transcriptional regulation of two genes specifically induced by glucose starvation in a hamster mutant fibroblast cell line. *J Biol Chem*, 258(1):597–603, Jan 1983.
- [161] G F Lewis, K D Uffelman, L W Szeto, B Weller et G Steiner. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest*, 95(1):158–166, Jan 1995.
- [162] W W Li, S Alexandre, X Cao et A S Lee. Transactivation of the grp78 promoter by  $Ca^{2+}$  depletion. a comparative analysis with a23187 and the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -atpase inhibitor thapsigargin. *J Biol Chem*, 268(16):12003–12009, Jun 1993.
- [163] Z Li, S Yang, H Lin, J Huang, P A Watkins, A B Moser, C Desimone, X Y Song et A M Diehl. Probiotics and antibodies to tnf inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 37(2):343–350, Feb 2003.

- [164] Guosheng Liang, Jian Yang, Jay D Horton, Robert E Hammer, Joseph L Goldstein et Michael S Brown. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver x receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem*, 277(11):9520–9528, Mar 2002.
- [165] W Liao, T Y Hui, S G Young et R A Davis. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apob secretion without causing retention or stress in the er. *J Lipid Res*, 44(5):978–985, May 2003.
- [166] C S Lieber, M A Leo, K M Mak, Y Xu, Q Cao, C Ren, A Ponomarenko et L M DeCarli. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*, 79(3):502–509, Mar 2004.
- [167] S Lillioja, J Foley, C Bogardus, D Mott et B V Howard. Free fatty acid metabolism and obesity in man : in vivo in vitro comparisons. *Metabolism*, 35(6):505–514, Jun 1986.
- [168] M C Lin, D Gordon et J R Wetterau. Microsomal triglyceride transfer protein (mtp) regulation in hepg2 cells : insulin negatively regulates mtp gene expression. *J Lipid Res*, 36(5):1073–1081, May 1995.
- [169] Xiaobo Lin, Pin Yue, Zhouji Chen et Gustav Schonfeld. Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice : results of a strain survey. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(6):G1179–G1189, Jun 2005.
- [170] E Little, G Tocco, M Baudry, A S Lee et S S Schreiber. Induction of glucose-regulated protein (glucose-regulated protein 78/bip and glucose-regulated protein 94) and heat shock protein 70 transcripts in the immature rat brain following status epilepticus. *Neuroscience*, 75(1):209–219, Nov 1996.

- [171] P Löfgren, J Hoffstedt, E Näslund, M Wirén et P Arner. Prospective and controlled studies of the actions of insulin and catecholamine in fat cells of obese women following weight reduction. *Diabetologia*, 48(11):2334–2342, Nov 2005.
- [172] F Lönnqvist, P Arner, L Nordfors et M Schalling. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med*, 1(9):950–953, Sep 1995.
- [173] Y Ma et L M Hendershot. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*, 107(7):827–830, Dec 2001.
- [174] G A Macdonald et J B Prins. Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 19(12):1335–1337, Dec 2004.
- [175] A Marcinkiewicz, D Gauthier, A Garcia et D L Brasaemle. The phosphorylation of serine 492 of perilipin directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem*, 281(17):11901–11909, Apr 2006.
- [176] S Martin et R G Parton. Lipid droplets : a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5):373–378, May 2006.
- [177] J Martinez-Botas, J B Anderson, D Tessier, A Lapillonne, B H Chang, M J Quast, D Gorenstein, K H Chen et L Chan. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *lepr(db/db)* mice. *Nat Genet*, 26(4):474–479, Dec 2000.
- [178] P Mauriège, D Prud'Homme, M Marcotte, M Yoshioka, A Tremblay et J P Després. Regional differences in adipose tissue metabolism between sedentary and endurance-trained women. *Am J Physiol*, 273(3 Pt 1):497–506, Sep 1997.



- [179] J A McGarr, L B Oscai et J Borensztajn. Effect of exercise on hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *Am J Physiol*, 230(2):385–388, Feb 1976.
- [180] R A Memon, L H Tecott, K Nonogaki, A Beigneux, A H Moser, C Grunfeld et K R Feingold. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (ppar-alpha) and ppar-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity : troglitazone induces expression of ppar-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*, 141(11):4021–4031, Nov 2000.
- [181] Miyazaki, S Miwa, H Kodama, H Yamada, K Nagata, W Toriumi, K Kitamura et E Kume. Hepatic and intestinal changes in rats treated with t-0126, a microsomal triglyceride transfer protein (mtp) inhibitor. *J Toxicol Sci*, 32(2):161–177, May 2007.
- [182] H Miyoshi, S C Souza, H H Zhang, K J Strissel, M A Christoffolete, J Kovsan, A Rudich, F B Kraemer, A C Bianco, M S Obin et A S Greenberg. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 281(23):15837–15844, Jun 2006.
- [183] C E Mondon, C B Dolkas, T Tobey et G M Reaven. Causes of the triglyceride-lowering effect of exercise training in rats. *J Appl Physiol*, 57(5):1466–1471, Nov 1984.
- [184] H P Moore, R B Silver, E P Mottillo, D A Bernlohr et J G Granneman. Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 280(52):43109–43120, Dec 2005.

- [185] K Mori. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 101(5):451–454, May 2000.
- [186] K Mori, W Ma, M J Gething et J Sambrook. A transmembrane protein with a .cdc2+/cdc28-related kinase activity is required for signaling from the er to the nucleus. *Cell*, 74(4):743–756, Aug 1993.
- [187] A Mourier, J F Gautier, E De Kerviler, A X Bigard, J M Villette, J P Garnier, A Duvallet, C Y Guezennec et G Cathelineau. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in niddm. effects of branched-chain amino acid supplements. *Diabetes Care*, 20(3):385–391, Mar 1997.
- [188] S Munro et H R Pelham. An hsp70-like protein in the er : identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46(2):291–300, Jul 1986.
- [189] G Musso, R Gambino et M Cassader. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (nafld). *Prog Lipid Res*, 48(1):1–26, Jan 2009.
- [190] Y Nakatani, H Kaneto, D Kawamori, K Yoshiuchi, M Hatazaki, T A Matsuoka, K Ozawa, S Ogawa, M Hori, Y Yamasaki et M Matsuhisa. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem*, 280(1): 847–851, Jan 2005.
- [191] H Nishitoh, A Matsuzawa, K Tobiume, K Saegusa, K Takeda, K Inoue, S Hori, A Kakizuka et H Ichijo. Ask1 is essential for endoplasmic reticulum stress-

induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, 16(11):1345–1355, Jun 2002.

- [192] M K Oh, J Winn et F Poordad. Review article : diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 28(5):503–522, Sep 2008.
- [193] J P Ong et Z M Younossi. Epidemiology and natural history of nafld and nash. *Clin Liver Dis*, 11(1):1–16, Feb 2007.
- [194] L B Oscai, R A Caruso, A C Wergeles et W K Palmer. Exercise and the camp system in rat adipose tissue. i. lipid mobilization. *J Appl Physiol*, 50(2):250–254, Feb 1981.
- [195] T Ota, C Gayet et H N Ginsberg. Inhibition of apolipoprotein b100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest*, 118(1):316–332, Jan 2008.
- [196] J L Owens, E O Fuller, D O Nutter et M DiGirolamo. Influence of moderate exercise on adipocyte metabolism and hormonal responsiveness. *J Appl Physiol*, 43(3):425–430, Sep 1977.
- [197] U Ozcan, Q Cao, E Yilmaz, A H Lee, N N Iwakoshi, E Ozdelen, G Tuncman, C Görgün, L H Glimcher et G S Hotamisligil. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695):457–461, Oct 2004.
- [198] U Ozcan, E Yilmaz, L Ozcan, M Furuhashi, E Vaillancourt, R O Smith, C Z Görgün et G S Hotamisligil. Chemical chaperones reduce er stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790):1137–1140, Aug 2006.

- [199] C Patil et P Walter. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus : the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3):349–355, Jun 2001.
- [200] D Pessayre et B Fromenty. Nash : a mitochondrial disease. *J Hepatol*, 42(6): 928–940, Jun 2005.
- [201] E T Poehlman, A Tremblay, M Marcotte, L Pérusse, G Thériault et C Bouchard. Heredity and changes in body composition and adipose tissue metabolism after short-term exercise-training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 56(4):398–402, 1987.
- [202] M P Portillo, E Simón, M A García-Calonge et A S Del Barrio. Effect of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous wat. *Eur J Nutr*, 38(4):177–182, Aug 1999.
- [203] C Postic et J Girard. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance : lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118(3):829–838, Mar 2008.
- [204] D Preiss et N Sattar. Non-alcoholic fatty liver disease : an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)*, 115(5): 141–150, Sep 2008.
- [205] P Puri, R A Baillie, M M Wiest, F Mirshahi, J Choudhury, O Cheung, C Sargeant, M J Contos et A J Sanyal. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 46(4):1081–1090, Oct 2007.
- [206] M Raabe, L M Flynn, C H Zlot, J S Wong, M M Véniant, R L Hamilton et S G Young. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice : reduced lipoprotein

secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15):8686–8691, Jul 1998.

- [207] M Raabe, M M Véniant, M A Sullivan, C H Zlot, J Björkegren, L B Nielsen, J S Wong, R L Hamilton et S G Young. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest*, 103(9):1287–1298, May 1999.
- [208] Michael W Rajala et Philipp E Scherer. Minireview : The adipocyte—at the cross-roads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144(9):3765–3773, Sep 2003.
- [209] M S Rao et J K Reddy. Pparalpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*, 40(4):783–786, Oct 2004.
- [210] P Rava, G K Ojakian, G S Shelness et M M Hussain. Phospholipid transfer activity of microsomal triacylglycerol transfer protein is sufficient for the assembly and secretion of apolipoprotein b lipoproteins. *J Biol Chem*, 281(16):11019–11027, Apr 2006.
- [211] G M Reaven et Y D Chen. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. *Diabetes Metab Rev*, 4(7):639–652, Nov 1988.
- [212] R S Rector, J P Thyfault, M J Laye, R T Morris, S J Borengasser, G M Uptergrove, M V Chakravarthy, F W Booth et J A Ibdah. Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in otsuka long-evans tokushima fatty (oletf) rats. *J Physiol*, 586(Pt 17):4241–4249, Sep 2008.
- [213] R S Rector, J P Thyfault, R T Morris, M J Laye, S J Borengasser, F W Booth et J A Ibdah. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents

steatosis in otsuka long-evans tokushima fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(3):619–626, Mar 2008.

- [214] J K Reddy. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. iii. peroxisomal beta-oxidation, ppar alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(6):1333–1339, Dec 2001.
- [215] J K Reddy et T Hashimoto. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha : an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21:193–230, 2001.
- [216] A Redonnet, R Groubet, C Noël-Suberville, S Bonilla, A Martinez et P Higuieret. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism*, 50(10):1161–1167, Oct 2001.
- [217] A M Reimold, N N Iwakoshi, J Manis, P Vallabhajosyula, E Szomolanyi-Tsuda, E M Gravalles, D Friend, M J Grusby, F Alt et L H Glimcher. Plasma cell differentiation requires the transcription factor xbp-1. *Nature*, 412(6844):300–307, Jul 2001.
- [218] S Reynisdottir, K Ellerfeldt, H Wahrenberg, H Lithell et P Arner. Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest*, 93(6):2590–2599, Jun 1994.
- [219] D Riviere, F Crampes, M Beauville et M Garrigues. Lipolytic response of fat cells to catecholamines in sedentary and exercise-trained women. *J Appl Physiol*, 66(1):330–335, Jan 1989.

- [220] J Robidoux, T L Martin et S Collins. Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure : a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:297–323, 2004.
- [221] M Rodbell. Modulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acid concentration in fat cell. *Ann N Y Acad Sci*, 131(1):302–314, Oct 1965.
- [222] S Rustaeus, K Lindberg, J Borén et S O Olofsson. Brefeldin a reversibly inhibits the assembly of apob containing lipoproteins in mca-rh7777 cells. *J Biol Chem*, 270(48):28879–28886, Dec 1995.
- [223] S Rustaeus, P Stillemark, K Lindberg, D Gordon et S O Olofsson. The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein b-100 very low density lipoprotein in mca-rh7777 cells. *J Biol Chem*, 273(9):5196–5203, Feb 1998.
- [224] A I Salhanick, S I Schwartz et J M Amatruda. Insulin inhibits apolipoprotein b secretion in isolated human hepatocytes. *Metabolism*, 40(3):275–279, Mar 1991.
- [225] A R Saltiel et C R Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865):799–806, Dec 2001.
- [226] V T Samuel, Z X Liu, X Qu, B D Elder, S Bilz, D Befroy, A J Romanelli et G I Shulman. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279(31):32345–32353, Jul 2004.
- [227] A J Sanyal, C Campbell-Sargent, F Mirshahi, W B Rizzo, M J Contos, R K Sterling, V A Luketic, M L Shiffman et J N Clore. Nonalcoholic steatohepatitis : association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5):1183–1192, Apr 2001.

- [228] A J Scheen et F H Luyckx. Obesity and liver disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16(4):703–716, Dec 2002.
- [229] G. Schonfeld et B. Pflieger. Utilization of exogenous free fatty acids for the production of very low density lipoprotein triglyceride by livers of carbohydrate-fed rats. *J Lipid Res*, 12(5):614–621, Sep 1971.
- [230] M Schröder et R J Kaufman. Er stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569(1-2):29–63, Jan 2005.
- [231] U Schubert, L C Antón, J Gibbs, C C Norbury, J W Yewdell et J R Bennink. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779):770–774, Apr 2000.
- [232] J P Schwartz et R L Jungas. Studies on the hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *J Lipid Res*, 12(5):553–562, Sep 1971.
- [233] Jean-Marc Schwarz, Peter Linfoot, Doris Dare et Karmen Aghajanian. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*, 77(1):43–50, Jan 2003.
- [234] D A Servetnick, D L Brasaemle, J Gruia-Gray, A R Kimmel, J Wolff et C Londos. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and leydig cells. *J Biol Chem*, 270(28):16970–16973, Jul 1995.
- [235] G S Shelness et J A Sellers. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*, 12(2):151–157, Apr 2001.
- [236] R E Shepherd, M D Bah et K M Nelson. Enhanced lipolysis is not evident in adipocytes from exercise-trained shr. *J Appl Physiol*, 61(4):1301–1308, Oct 1986.



- [237] Y Shi, K M Vatter, R Sood, J An, J Liang, L Stramm et R C Wek. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, pek, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18(12):7499–7509, Dec 1998.
- [238] H. Shimano, J. D. Horton, I. Shimomura, R. E. Hammer, M. S. Brown et J. L. Goldstein. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*, 99(5):846–854, Mar 1997.
- [239] I. Shimomura, M. Matsuda, R. E. Hammer, Y. Bashmakov, M. S. Brown et J. L. Goldstein. Decreased irs-2 and increased srebp-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*, 6(1):77–86, Jul 2000.
- [240] I. Shimomura, H. Shimano, J. D. Horton, J. L. Goldstein et M. S. Brown. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, 99(5):838–845, Mar 1997.
- [241] I. Shimomura, H. Shimano, B. S. Korn, Y. Bashmakov et J. D. Horton. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem*, 273(52):35299–35306, Dec 1998.
- [242] R P Shiu, J Pouyssegur et I Pastan. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(9):3840–3844, Sep 1977.

- [243] C C Shoulders, D J Brett, J D Bayliss, T M Narcisi, A Jarmuz, T T Grantham, P R Leoni, S Bhattacharya, R J Pease et P M Cullen. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kda subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet*, 2(12):2109–2116, Dec 1993.
- [244] C A Siegrist-Kaiser, V Pauli, C E Juge-Aubry, O Boss, A Pernin, W W Chin, I Cusin, F Rohner-Jeanrenaud, A G Burger, J Zapf et C A Meier. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*, 100(11):2858–2864, Dec 1997.
- [245] C Simonelli et R P Eaton. Reduced triglyceride secretion : a metabolic consequence of chronic exercise. *Am J Physiol*, 234(3):221–227, Mar 1978.
- [246] R Sitia et I Braakman. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426(6968):891–894, Dec 2003.
- [247] S C Souza, L M de Vargas, M T Yamamoto, P Lien, M D Franciosa, L G Moss et A S Greenberg. Overexpression of perilipin a and b blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3t3-l1 adipocytes. *J Biol Chem*, 273(38):24665–24669, Sep 1998.
- [248] J D Sparks et C E Sparks. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein b by rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 265(15):8854–8862, May 1990.
- [249] J D Sparks et C E Sparks. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta*, 1215(1-2):9–32, Nov 1994.
- [250] J D Sparks, C E Sparks et L L Miller. Insulin effects on apolipoprotein b produc-

tion by normal, diabetic and treated-diabetic rat liver and cultured rat hepatocytes. *Biochem J*, 261(1):83–88, Jul 1989.

- [251] B Stallknecht, L Simonsen, J Bülow, J Vinten et H Galbo. Effect of training on epinephrine-stimulated lipolysis determined by microdialysis in human adipose tissue. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 1):1059–1066, Dec 1995.
- [252] J Stevens, M H Green, D L Kaiser et S L Pohl. Insulin resistance in adipocytes from fed and fasted obese rats : dissociation of two insulin actions. *Mol Cell Biochem*, 37(3):177–183, Jul 1981.
- [253] V Stich et M Berlan. Physiological regulation of nefa availability : lipolysis pathway. *Proc Nutr Soc*, 63(2):369–374, May 2004.
- [254] V Stich, I De Glisezinski, F Crampes, J Hejnova, J M Cottet-Emard, J Galitzky, M Lafontan, D Rivière et M Berlan. Activation of alpha(2)-adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in scat of obese subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(2):499–504, Aug 2000.
- [255] V Stich, F Marion-Latard, J Hejnova, N Viguerie, C Lefort, H Suljkovicova, D Langin, M Lafontan et M Berlan. Hypocaloric diet reduces exercise-induced alpha 2-adrenergic antilipolytic effect and alpha 2-adrenergic receptor mrna levels in adipose tissue of obese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3):1274–1281, Mar 2002.
- [256] C L Su, C Sztalryd, J A Contreras, C Holm, A R Kimmel et C Londos. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem*, 278(44):43615–43619, Oct 2003.

- [257] V Subramanian, A Rothenberg, C Gomez, A W Cohen, A Garcia, S Bhattacharyya, L Shapiro, G Dolios, R Wang, M P Lisanti et D L Brasaemle. Perilipin a mediates the reversible binding of cgi-58 to lipid droplets in 3t3-l1 adipocytes. *J Biol Chem*, 279(40):42062–42071, Oct 2004.
- [258] S Sundar Rajan, V Srinivasan, M Balasubramanyam et U Tatu. Endoplasmic reticulum (er) stress & diabetes. *Indian J Med Res*, 125(3):411–424, Mar 2007.
- [259] A Suzuki, K Lindor, J St Saver, J Lymp, F Mendes, A Muto, T Okada et P Angulo. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 43(6):1060–1066, Dec 2005.
- [260] C Taghibiglou, A Carpentier, S C Van Iderstine, B Chen, D Rudy, A Aiton, G F Lewis et K Adeli. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular apob degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem*, 275(12):8416–8425, Mar 2000.
- [261] C Taghibiglou, F Rashid-Kolvear, S C Van Iderstine, H Le-Tien, I G Fantus, G F Lewis et K Adeli. Hepatic very low density lipoprotein-apob overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1b in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem*, 277(1):793–803, Jan 2002.
- [262] H Taguchi, T Omachi, T Nagao, N Matsuo, I Tokimitsu et H Itakura. Dietary diacylglycerol suppresses high fat diet-induced hepatic fat accumulation and microsomal triacylglycerol transfer protein activity in rats. *J Nutr Biochem*, 13(11): 678–683, Nov 2002.

- [263] S Tamura et I Shimomura. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5):1139–1142, May 2005.
- [264] J T Tansey, C Sztalryd, J Gruia-Gray, D L Roush, J V Zee, O Gavrilova, M L Reitman, C X Deng, C Li, A R Kimmel et C Londos. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11):6494–6499, May 2001.
- [265] J T Tansey, C Sztalryd, E M Hlavin, A R Kimmel et C Londos. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*, 56(7):379–385, Jul 2004.
- [266] K Tauchi-Sato, S Ozeki, T Houjou, R Taguchi et T Fujimoto. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem*, 277(46):44507–44512, Nov 2002.
- [267] U J Tietge, A Bakillah, C Maugeais, K Tsukamoto, M Hussain et D J Rader. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (mtp) results in increased in vivo secretion of vldl triglycerides and apolipoprotein b. *J Lipid Res*, 40(11):2134–2139, Nov 1999.
- [268] Maureen T Timlin et Elizabeth J Parks. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr*, 81(1):35–42, Jan 2005.
- [269] K. Tobe, R. Suzuki, M. Aoyama, T. Yamauchi, J. Kamon, N. Kubota, Y. Terauchi, J. Matsui, Y. Akanuma, S. Kimura, J. Tanaka, M. Abe, J. Ohsumi, R. Nagai et T. Kadowaki. Increased expression of the sterol regulatory element-binding

- protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *J Biol Chem*, 276(42):38337–38340, Oct 2001.
- [270] K Toode, A Viru et A Eller. Lipolytic actions of hormones on adipocytes in exercise-trained organisms. *Jpn J Physiol*, 43(2):253–258, 1993.
- [271] D M Torres et S A Harrison. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 134(6):1682–1698, May 2008.
- [272] Y E Tsekouras, F Magkos, Y Kellas, K N Basioukas, S A Kavouras et L S Sidos. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very low-density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4):851–858, Oct 2008.
- [273] H S Um, E B Kang, Y H Leem, I H Cho, C H Yang, K R Chae, D Y Hwang et J Y Cho. Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for alzheimer's disease in an nse/appsw-transgenic model. *Int J Mol Med*, 22(4):529–539, Oct 2008.
- [274] F Urano, X Wang, A Bertolotti, Y Zhang, P Chung, H P Harding et D Ron. Coupling of stress in the er to activation of jnk protein kinases by transmembrane protein kinase ire1. *Science*, 287(5453):664–666, Jan 2000.
- [275] K M Utzschneider et S E Kahn. Review : The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(12):4753–4761, Dec 2006.
- [276] D R Van Harken, C W Dixon et M Heimberg. Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes. v. the effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis. *J Biol Chem*, 244(9):2278–2285, May 1969.

- [277] J A Villena, S Roy, E Sarkadi-Nagy, K H Kim et H S Sul. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids : ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, 279(45):47066–47075, Nov 2004.
- [278] D Wang, Y Wei et M J Pagliassotti. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*, 147(2):943–951, Feb 2006.
- [279] S P Wang, N Laurin, J Himms-Hagen, M A Rudnicki, E Levy, M F Robert, L Pan, L Oligny et G A Mitchell. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res*, 9(2):119–128, Feb 2001.
- [280] I J Waterman et V A Zammit. Differential effects of fenofibrate or simvastatin treatment of rats on hepatic microsomal overt and latent diacylglycerol acyltransferase activities. *Diabetes*, 51(6):1708–1713, Jun 2002.
- [281] Y Wei, R S Rector, J P Thyfault et J A Ibdah. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*, 14(2):193–199, Jan 2008.
- [282] J R Wetterau, L P Aggerbeck, M E Bouma, C Eisenberg, A Munck, M Hermier, J Schmitz, G Gay, D J Rader et R E Gregg. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*, 258(5084):999–1001, Nov 1992.
- [283] J R Wetterau, M C Lin et H Jamil. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta*, 1345(2):136–150, Apr 1997.
- [284] D A White, A J Bennett, M A Billett et A M Salter. The assembly of

triacylglycerol-rich lipoproteins : an essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr*, 80(3):219–229, Sep 1998.

- [285] C H Wiegman, R H Bandsma, M Ouwens, F H van der Sluijs, R Havinga, T Boer, D J Reijngoud, J A Romijn et F Kuipers. Hepatic vldl production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes*, 52(5):1081–1089, May 2003.
- [286] R. R. Wolfe, S. Klein, F. Carraro et J. M. Weber. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol*, 258(2 Pt 1):E382–E389, Feb 1990.
- [287] N E Wolins, B K Quaynor, J R Skinner, A Tzekov, M A Croce, M C Gropler, V Varma, A Yao-Borengasser, N Rasouli, P A Kern, B N Finck et P E Bickel. Oxpap/pat-1 is a ppar-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*, 55(12):3418–3428, Dec 2006.
- [288] N. E. Wolins, B. Rubin et D. L. Brasaemle. Tip47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*, 276(7):5101–5108, Feb 2001.
- [289] Nathan E Wolins, James R Skinner, Marissa J Schoenfish, Anatoly Tzekov, Kenneth G Bensch et Perry E Bickel. Adipocyte protein s3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem*, 278(39):37713–37721, Sep 2003.
- [290] C Xu, B Bailly-Maitre et J C Reed. Endoplasmic reticulum stress : cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 115(10):2656–2664, Oct 2005.
- [291] T Yamaguchi, N Omatsu, S Matsushita et T Osumi. Cgi-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. possible involvement of cgi-58 mislocalization in chnarin-dorfman syndrome. *J Biol Chem*, 279(29):30490–30497, Jul 2004.



- [292] X Yang, P A Jansson, I Nagaev, M M Jack, E Carvalho, K S Sunnerhagen, M C Cam, S W Cushman et U Smith. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(4):1045–1051, May 2004.
- [293] K Zhang et R J Kaufman. The unfolded protein response : a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*, 66(2 Suppl 1):102–109, Jan 2006.
- [294] X Zhang, M Tengowski, L Fasulo, S Botts, S A Suddarth et G A Johnson. Measurement of fat/water ratios in rat liver using 3d three-point dixon mri. *Magn Reson Med*, 51(4):697–702, Apr 2004.
- [295] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold et J. M. Friedman. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (6505):425–432, Dec 1994.
- [296] Y L Zhang, A Hernandez-Ono, C Ko, K Yasunaga, L S Huang et H N Ginsberg. Regulation of hepatic apolipoprotein b-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. i. differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J Biol Chem*, 279(18):19362–19374, Apr 2004.
- [297] R Zimmermann, J G Strauss, G Haemmerle, G Schoiswohl, R Birner-Gruenberger, M Riederer, A Lass, G Neuberger, F Eisenhaber, A Hermetter et R Zechner. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700):1383–1386, Nov 2004.